FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1939 № 21

THÈSE

présentée pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

par

Jacques BOY
Ancien interne des Hôpitaux
Licencié ès-sciences
Assistant à l'Institut de Bactériologie
né le 2 janvier 1909 à Tunis

Recherches physico-chimiques sur la toxine diphtérique et son mode de formation

Président: F. VLÈS, Professeur

STRASBOURG
Imprimerie Ch. & J. Goeller, 6c, Place d'Austerlitz
1939

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1939 № 21

THÈSE

présentée pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

par

Jacques BOY
Ancien interne des Hôpitaux
Licencié ès-sciences
Assistant à l'Institut de Bactériologie
né le 2 janvier 1909 à Tunis

Recherches physico-chimiques sur la toxine diphtérique et son mode de formation

Président: F. VLÈS, Professeur

STRASBOURG
Imprimerie Ch. & J. Goeller, 6c, Place d'Austerlitz
1939

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Doyen . . . . . MM. FORSTER ✻ ✪ I.
Assesseur . . . . . SCHAEFFER ✪ I.

Professeurs

Embryologie.	MM. ANCEL ✻ ✪ I.
Anatomie	FORSTER ✻ ✪ I.
Histologie	BOUIN O. ✻ ✪ I.
Physiologie	SCHAEFFER ✻ ✪ I.
Physique biologique. . . .	VLÈS ✻ ✪ I.
Chimie biologique	NICLOUX O ✻ ✪ I.
Anatomie pathologique . . .	MASSON ✻ ✪ I.
Pharmacologie, Médecine expérimentale	SCHWARTZ ✪ I.
Hygiène. Bactériologie. . . .	OBERLING ✻ ✪ A.
Médecine légale	SIMONIN ✻ ✪ I.
Clinique médicale	MERKLEN ✻ ✪ I. AMBARD ✻ ✪ I.
Clinique chirurgicale . . .	LERICHE O. ✻ ✪ I.
Clinique ophtalmologique. . .	REDSLOB ✻ ✪ I.
Clinique dermatologique . .	PAUTRIER O. ✻ ✪ I
Clinique psychiatrique . . .	PFERSDORFF ✻ ✪ I
Clinique neurologique . . .	BARRÉ ✻ ✪ I.
Clinique gynécologique et accouchements	REEB ✪ I.
Clinique infantile	ROHMER ✻ ✪ I.
Clinique oto-rhino-laryngologique	CANUYT ✻ ✪ I.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	VAUCHER ✻ ✪ I.

Professeurs sans chaire :

MM. ARON Max ✻ ✪ I. MM. GERY ✪ I.
BELLOCQ ✻ ✪ I.

Chargés de cours et Agrégés :

MM. BENOIT ✪ A. MM. KELLER ✪ I.
FONTAINE ✪ A. KREIS ✪ A.
GELMA ✻ ✪ I REISS
GUNSETT O. ✻ ✪ THIVOLLE ✪ A.
HANNS O. ✻ ✪ I. WAITZ
HUMBERT ✻ ✪ A WEISS A. ✻ ✪ A.
KAYSER ✪ A. WOLF ✻ ✪ A.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Agrégé libre: M. SIMON ✻ ✪ A.

Directeur de la Clinique dentaire: M. ROMEY O. ✻ ✪ A.

Chargés d'un cours complémentaire :

MM. M. MEYER ✪ I. ROEDERER ✪ I.

Professeurs honoraires :

MM. CHAVIGNY C. ✻ ✪ I. WEILL ✻ ✪ I.
STOLZ ✻ ✪ I.

Serment d'Hippocrate.

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Etre suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque!

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur F. VLES

qui m'a inspiré le sujet de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance.

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur Ch. OBERLING

que je remercie de l'intérêt constant qu'il a porté à mes recherches et des intéressantes suggestions qu'il m'a faites. Il est pour moi un maître bienveillant; qu'il soit assuré de mon respectueux attachement et de ma profonde admiration.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DES SCIENCES.

A MES MAITRES D'EXTERNAT ET D'INTERNAT.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548026_0085

PREFACE.

L'introduction en bactériologie des méthodes chimiques et physico-chimiques lui apporte de précieux renseignements qui permettent de comprendre ses découvertes empiriques. Malheureusement bien des bactériologistes considèrent ces méthodes comme dépourvues d'intérêt pratique et trop éloignées de leur domaine.

Aussi les renseignements précis que nous avons sur le métabolisme microbien nous sont, le plus souvent, apportés par les biochimistes. Mais ces derniers étudient principalement des espèces dont la culture en milieu chimiquement défini est facile (champignons inférieurs, b.coli, proteus, etc...). Ces données, très intéressantes pour le physiologiste, n'apportent que des renseignements de peu de valeur pour le bactériologiste qui s'occupe principalement des espèces pathogènes.

La collaboration intime des travailleurs appartenant à des disciplines différentes, déjà réalisée par les chercheurs américains, rencontre encore trop souvent en France des obstacles. Aussi est-ce avec joie que j'ai entrepris le présent travail, suggéré par Monsieur le Professeur F. Vlès, *qui m'a familiarisé avec les techniques physico-chimiques. Les travailleurs de l'Institut de Physique biologique m'ont initié à leur pratique et je tiens à leur témoigner ici ma gratitude. Je suis spécialement reconnaissant à Monsieur le Professeur agrégé* P. Reiss *pour les précieux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer dans l'étude que je poursuis sous ses directives du r H des cultures.*

Je dois à ma collaboration avec Mademoiselle E. Le Breton *d'avoir compris l'intérêt physiologique qui s'attache à cette question et la nécessité préalable d'une étude chimique approfondie pour laquelle elle veut bien me guider de ses conseils, ce dont je la remercie.*

Je suis reconnaissant à MM. Philippe *et* Loiseau, *qui m'ont fait profiter de leur haute compétence et m'ont fourni les toxines, bouillons et souches dont j'avais besoin. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde estime.*

INTRODUCTION.

Depuis sa découverte en 1889 par Roux et Yersin (128) la toxine diphtérique a fait l'objet de nombreux travaux tendant à élucider tant les conditions de sa formation, que sa constitution chimique et ses effets sur l'organisme.

Laissant de côté l'intoxication dont la symptomatologie est d'ailleurs infiniment mieux connue que les mécanismes d'action, dans ce travail nous ne nous occuperons que des conditions d'élaboration de cette exotoxine dans les milieux de culture du bacille ainsi que de ses propriétés physico-chimiques.

La nature des exotoxines est loin d'être précisée, contrairement à celle des endotoxines dont l'étude a fait, ces dernières années, de grands progrès permettant de mieux comprendre les phénomènes d'immunité. La labilité beaucoup plus grande des exotoxines explique une partie des obstacles rencontrés au cours de leur isolement, ceux-ci sont de nature analogue à ceux qui ont longtemps arrêté les biochimistes dans la caractérisation de la constitution chimique des ferments. Comme dans le cas des diastases, les manipulations telles que précipitations, adsorbtions, séparations par voies chimique ou physique, entraînent des pertes d'activité considérables qui rebutent le chercheur et compliquent le problème. Dans les deux cas, la question se pose de savoir si le protide ou les protides entraînés au cours des opérations de purification font partie intégrante de l'enzyme ou de la toxine, en sont le support spécifique ou si ce sont simplement des impuretés dont il est difficile de se débarrasser.

Ces dernières années, la chimie des diastases a réalisé, elle, de grands progrès, puisqu'on a pu obtenir à l'état cristallisé non seulement l'uréase (Summer), mais quelques ferments protéolytiques, pepsine, trypsine (Northrop), carboxypolypeptidase (Anson). Toutes se présentent comme des protides purs dont certains groupements atomiques constitu-

tifs seraient responsables de l'activité diastasique. Par contre l'étude des transporteurs d'hydrogène, tel le ferment jaune de Warburg, révèle que, si leur activité est accrue par la présence d'un support protidique, ce support n'est pas la partie spécifique responsable de l'activité, celle-ci est d'un poids moléculaire plus faible, de constitution parfaitement connue et a dans plusieurs cas été obtenue synthétiquement (flavine, amide nicotinique, etc.).

Actuellement rien ne permet de prévoir si la constitution des exotoxines se révèlera comme analogue à l'une ou l'autre de ces deux catégories de catalyseurs biologiques, mais les tentatives faites à ce jour n'ont pas permis de les séparer d'un support protidique.

Il nous a semblé logique de commencer nos recherches sur la toxine diphtérique dans 2 voies différentes:

1° Etude des possibilités de culture des bacilles diphtériques dans des milieux de composition définie et simple. Pour y arriver nous avons, dans un premier temps, déterminé les conditions physico-chimiques optimales qui se trouvent réalisées dans les milieux complexes empiriques, connus comme assurant le meilleur rendement en toxine, et tenté de dégager celles qui conditionnent cette production.

2° D'autre part nous avons établi les courbes de neutralisation et d'effets tampon des protides qui accompagnent la toxine ou sur lesquels elle se fixe préférentiellement.

Ce sont ces recherches préliminaires qu'on trouvera rassemblées dans le présent travail. Elles ont constitué l'introduction indispensable aux expériences que nous poursuivons avec Mlle E. Le Breton sur l'isolement à l'état pur et les propriétés physiologiques de la toxine diphtérique.

DEFINITION.

La toxine diphtérique est classiquement rangée parmi les exotoxines, qui s'opposent aux endotoxines.

La définition de ces dernières est facile et ne peut prêter à discussion: on appelle endotoxines celles qui ne peuvent être mises en évidence dans les milieux de culture, mais doivent extraites des corps microbiens eux-mêmes. Leurs effets toxiques peuvent être mis en évidence par l'injection à l'animal sensible du corps microbien tué par diverses méthodes.

Il semblerait qu'on doive définir exotoxine, une substance présente dans le milieu de culture après élimination des corps microbiens et qui injectée à l'animal sensible en dose suffisante, le tue avec une symptomatologie caractéristique.

Endo- et exotoxines ont en commun la propriété antigène révélée par l'apparition, dans le sang des animaux injectés, d'anticorps spécifiques, que la toxine soit injectée comme telle, à doses infra mortelles, progressivement croissantes, ou après un traitement approprié la rendant atoxique (formolisation, chauffage, vieillissement).

La définition que nous venons de donner d'une exotoxine reste purement formelle et ne préjuge en rien de son origine; qu'il s'agisse d'un produit de sécrétion du bacille dans le milieu extérieur, d'un déchet résultant de son activité métabolique intra- ou extracellulaire (corps synthétisé dans le milieu à l'aide de catalyseurs rejetés par le microbe), voire même d'un constituant protoplasmique ayant franchi la membrane par suite d'un début de lyse dû au vieillissement de la culture. (P. J. Molonay et L. Hanna) (92).

Il est évident que dans ce dernier cas, du point de vue signification biologique, bien que présente dans le milieu de culture, la toxine serait par son origine une «endotoxine».

L'arbitraire d'une telle classification apparaît donc nettement.

La toxine diphtérique est-elle un produit de sécrétion? un corps synthétisé dans le milieu extérieur comme le sup-

posent Dernby et Walbum (35)? ou un constituant d'une lyse partielle?

Pour certains auteurs, il ne s'agirait pas d'un corps synthétisé dans le milieu puisqu'on peut l'extraire des corps bactériens d'où elle passerait dans le bouillon de culture (Boivin) *). Les intéressantes recherches de Prigge (117) renforcent cette opinion, puisque des bacilles lavés soumis à des pressions de 300 atmosphères lui ont livré un extrait riche en toxine.

Le fait qu'il y a des cultures diphtériques sans toxine permet d'affirmer par ailleurs qu'il ne s'agit pas d'un constituant cellulaire essentiel, puisque sa présence est contingente.

Quant à son mode d'action, que Doyon et Courmont (37), s'appuyant sur les expériences de Delzenne sur le venin de cobra, ont supposé être enzymatique, il faut bien avouer qu'il est loin d'être complètement élucidé. Boivin (13), Eaton (43) et Pappenheimer (106), qui ont obtenu la toxine sous une forme hautement purifiée, la considèrent comme étant une protéine dont le poids moléculaire est voisin de 17.000.

TESTS DE DOSAGE.

1. *Tests «in vivo».*

Les définitions des unités de mesure adoptées dans tous les laboratoires sont maintenant classiques.

Rappelons que le pouvoir toxique se dose soit sur le cobaye, soit sur le lapin.

La dose minima mortelle (D.M.M.) ou «minimum lethal dose» des auteurs américains (M.L.D.) est la plus petite quantité de toxine qui, injectée au cobaye de 250 g., provoque la mort de l'animal en 96 heures. Cette dose, avec les toxines actuellement préparées, oscille entre 1/1000 et 1/3000 de cm^3.

A la suite d'un travail de Rohmer sur l'action nécrosante de la toxine sur la peau du cobaye, certains auteurs ont substitué, à la méthode coûteuse du pouvoir lethal, une méthode de dosage par injection intracutanée de toxine dans la peau du cobaye (Glenny) ou du lapin (Jensen) (67). La dose minima qui donne une escarre est prise comme unité.

Certains auteurs emploient comme test la dose minima donnant une réaction érythémateuse sur la peau du lapin blanc.

On a désigné ces unités par diverses initiales: Lr., Ln.

*) loco cit. p. 458 in Ann. Inst. Part., t. 61. 1938.

Ces méthodes sont évidemment beaucoup plus économiques que l'injection au cobaye, car un lapin permet de faire 50 dosages, mais elles supposent que la réaction érythémateuse ou nécrosante est due à la toxine elle-même. N'est-elle pas favorisée ou inhibée par les impuretés qui l'accompagnent?

En opérant dans des conditions sensiblement analogues de telles méthodes sont donc acceptables; mais, lorsque l'on a débarrassé la toxine des impuretés qui l'accompagnent, peut-on comparer les résultats que donne la toxine purifiée à ceux que donne la toxine brute?

La diversité de ces méthodes de dosage rend difficile la comparaison des résultats des divers auteurs. Certains emploient la dose minima nécrosante sur le lapin, d'autres sur le cobaye, d'autres la dose minima donnant l'érythème sur l'un ou l'autre de ces animaux.

La question se complique encore du fait que certains auteurs emploient, par la méthode intracutanée sur le lapin ou le cobaye, le mode de dosage L+. La dose L+ est la quantité de toxine qui, ajoutée à une unité antitoxique, provoque la mort du cobaye de 250 g. en 96 heures.

Parallèlement, on a cherché à déterminer la dose minima qui, ajoutée à 1/500 d'unité antitoxique, provoque une réaction érythémateuse ou nécrosante sur la peau de cobaye. A cette unité, Glenny et Allen donnent l'initiale Lr/500.

En résumé, toutes ces méthodes compliquent à tort la littérature.

Nous avons employé le dosage sur le cobaye par recherche de la D.M.M. qui nous semble adaptée à la définition de la quantité de *toxine* présente dans une préparation donnée, indépendamment des quantités de substance à propriété antigène ou nécrosante.

2. *Test «in vitro».*

La propriété que possède la toxine diphtérique de floculer in vitro par mélange avec un sérum antitoxique, mise en évidence par Danyz (26), par M. Nicolle, Cesari et Debains (100) et par Ramon (121), a permis à ce dernier d'établir une méthode de dosage in vitro.

Comme le prouvent les travaux de Ramon, le pouvoir floculant est parallèle au pouvoir antigénique de la toxine *mais non à sa propriété toxique.*

Cette méthode est très commode, rapide et économique et rien ne s'oppose à son emploi lorsque l'on veut comparer

des bouillons toxiques bruts, préparés dans des conditions analogues. Il en va tout autrement lorsque l'on se propose de purifier la toxine. Dans ce cas il est indispensable de se rappeler que la floculation ne dose que la propriété antigénique; certains auteurs semblent oublier ce fait si capital et calculent le degré de purification d'une «toxine» d'après la quantité d'azote par «unité floculante»; ce qui est inadmissible. L'expérience montre en effet, qu'au cours des manipulations de purification, on arrive facilement à récupérer une grosse partie du pouvoir antigénique (relativement stable), alors que le pouvoir toxique, lui, est l'objet d'une destruction importante (Pappenheimer (106), page 549).

Le dosage in vitro s'opère suivant la méthode indiquée et mise en œuvre par Ramon. Elle consiste à chercher la quantité de sérum qui, ajoutée à un centimètre cube de toxine, produit la floculation dans le temps minimum. Supposons que 1 cm^3 de toxine, mélangé avec 40 unités antitoxiques donne la «floculation primitive», on dira que cette toxine contient 40 U. F. (unités floculantes).

Le temps de floculation est important. Il est désigné par Schmidt sous les initiales K f.

La valeur des toxines, préparées à l'Institut Pasteur, que nous avons employées est en général aux environs de 45 U. F.

PREMIERE PARTIE.

CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA CULTURE DU BACILLE DIPHTERIQUE EN VUE DE LA PRODUCTION DE TOXINE.

La préparation de la toxine diphtérique est une opération délicate où interviennent des facteurs variés dont certainement nous ignorons aujourd'hui encore un certain nombre.

Dans ce chapitre nous voudrions préciser les points acquis à l'heure actuelle sur ce sujet par les recherches empiriques qui ont amené les auteurs à modifier les conditions de préparation du milieu de culture.

1° L'un des facteurs sur lequel a tout d'abord été attirée l'attention des chercheurs est le rôle de l'évolution du pH dans les cultures. Diverses méthodes pour empêcher l'acidification des cultures furent mises en œuvre que nous passerons en revue. Nous relaterons ensuite nos recherches personnelles sur l'étude physico-chimique des bouillons servant à la production de toxine par l'étude de la courbe d'effet-tampon.

2° Un deuxième facteur mis en relief par divers chercheurs est l'influence du rapport volume sur surface du milieu de culture Les recherches empiriques ayant montré son importance, nous rapporterons les expériences tendant à expliquer le rôle de ce facteur par l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction dans la culture.

3° Enfin, nous ferons une revue rapide des connaissances acquises à ce jour sur l'importance de certains facteurs chimiques dans le développement du bacille et la production de la toxine et des rapports de ces facteurs avec le rH.

CHAPITRE PREMIER.

EVOLUTION DU pH DANS LES CULTURES.

Roux et Yersin (128) dans leurs premières recherches obtinrent une toxine extrêmement peu active puisqu'il en fallait plusieurs centimètres cubes pour provoquer la mort du cobaye. Dans leurs essais ultérieurs ils firent les premiers la remarque que l'acidification que subissait le milieu de culture avait un effet néfaste sur la production de toxine. La toxicité au contraire augmentait lorsque le milieu était redevenu alcalin: «Les cultures du bacille de la diphtérie, disent-ils, dans le bouillon de veau légèrement alcalin, deviennent acides dans les premiers jours et prennent une réaction alcaline après un temps plus ou moins long. Tant que la culture est acide, son pouvoir toxique n'est pas considérable et il est nécessaire d'injecter aux animaux une grande quantité de liquide filtré. Plus tard, lorsque la culture est alcaline, sa puissance toxique a beaucoup augmenté.»

Spronck (145) en 1895 attribua à la fermentation des hydrates de carbone contenus dans la viande cette acidification.

Dans un mémoire, paru en 1922, dans les Annales de l'Institut Pasteur, Abt et Loiseau (3) firent une étude systématique de l'évolution du pH dans les cultures diphtériques et des rapports de ce phénomène avec la toxicité du produit obtenu. Confirmant les travaux de Roux et Yersin et de Spronck, ils virent que l'acidification du milieu débutait après les premières 24 heures, atteignait son maximum le 3e jour; ensuite le pH remontait. Ils attirent l'attention sur le fait que, lorsque l'on emploie le bouillon Martin, les variations du pH sont moins marquées et le produit plus régulièrement toxique. Dans de certaines limites, le pH initial de la culture n'a que peu d'influence sur cette réaction.

Walbum (166) dans divers mémoires confirme ces résultats et constate de même la baisse du pH dans les 3 premiers jours puis sa remontée à partir de ce temps.

P. Hartley et O. M. Hartley (58) obtiennent les mêmes résultats sur des milieux préparés à partir de trois peptones commerciales différentes.

Ces études ont dans la suite été reprises par Schmidt (133), puis par Watson et Wallace (168) (169), qui arrivèrent aux mêmes conclusions.

Ces travaux nous permettent de considérer à l'heure actuelle comme un fait acquis que les cultures de bacille diphtérique passent par une phase d'acidité due à la fermentation des hydrates de carbone qui inhibe pousse et production de toxine lorsqu'elle est trop marquée. Dans les jours qui suivent, elle disparaît et fait place à une période d'alcalinisation due à la formation d'ammoniaque. Le renversement de la réaction se produit vers le 3e ou 4e jour de culture. La toxine n'acquiert un taux élevé que lorsque le milieu est redevenu alcalin.

Pour obtenir des produits actifs les auteurs se sont donc efforcés de parer à cette acidification. L'expérience a montré que pour obtenir de bonnes toxines il fallait employer certaines peptones peu dégradées. L'importance de la qualité de la peptone dans la préparation du milieu a suscité de nombreuses recherches.

Abt et Loiseau (2), puis Philippe et Loiseau (111bis) montrèrent la supériorité de la peptone préparée suivant la technique de Martin (85).

De nombreuses peptones ont été étudiées et recommandées (travaux de O. Hida (61), 1910, Douglas, 1914, V. Groer et Sruka (52), 1918, L. Dawis (29), 1920, Dernby et David, 1921, Walbum (166), 1921, Hartley (58), Marbe et Olariu (83), Wadsworth (161), Smith (144), etc...).

A l'heure actuelle, les milieux les plus communément employés sont soit le milieu Martin, soit le milieu de Douglas, soit un milieu préparé à partir de la Protéose peptone Difco.

Sur ces milieux la pousse du bacille est rapide; les variations du pH ne sont pas très marquées.

L'adjonction de sucres fermentescibles par le bacille n'entraîne pas de chute du pH incompatible avec le développement microbien. Sur ces milieux glucosés, le pH au troisième jour ne dépasse pas pH = 6,5 et la production de toxine est bonne.

Il y a donc lieu de penser que ces milieux sont suffisamment tamponnés pour que la production d'acides, secon-

daire à la fermentation du glucose, n'ait pas d'influence trop marquée sur l'évolution du pH de la culture.

Nous nous sommes proposés de vérifier ce fait en étudiant comparativement les courbes d'effet tampon de divers milieux de culture.

ETUDE DES COURBES D'EFFET TAMPON DES MILIEUX DE CULTURE.

Principe de la méthode: On appelle courbe de *neutralisation*, la courbe exprimant la variation du pH d'une solution pour des additions progressives d'acide ou de base. On l'établit en portant les variations de pH en abscisse et les quantités d'acide ou de base en ordonnée. On obtient ainsi une courbe en S plus ou moins régulière suivant la composition de la solution. Les paliers de la courbe correspondent à des régions de faible pouvoir tampon, alors que les points d'inflexion correspondent au passage de la courbe par les pK des constituants pour lesquels le pouvoir tampon de la solution augmente.

La courbe de coefficient tampon, calculée d'après la courbe de neutralisation, donne la valeur du pouvoir tampon pour les différentes valeurs de pH.

On calcule le pouvoir tampon d'après la relation:

$t = \frac{\Delta q \; n}{\Delta pH \times V}$. Δq = cm³ ajoutés; Δ pH = variation de pH; n = normalité du réactif; V = volume de la solution.

Cette courbe est en somme la dérivée de la courbe de neutralisation.

1. Technique employée.

Le bouillon à étudier est dilué au 1/5ᵉ. On prélève 20 cm³ de cette solution que l'on place dans l'entonnoir du dispositif décrit par Vlès (155) pour la mesure du pH à l'électrode d'antimoine en différentiel. On mesure le pH en suivant la technique mise au point dans un travail de M. Gex (49). On rajoute ensuite une certaine quantité d'acide ou de base et, après stabilisation du potentiel, on mesure à nouveau le pH. On rajoute une nouvelle quantité de réactif; et ainsi de suite.

Nous donnons ci-après un exemple de courbe de neutralisation de bouillon ordinaire dilué à 1/5ᵉ, volume total 20 cm³, réactifs: n/10 (figure 1).

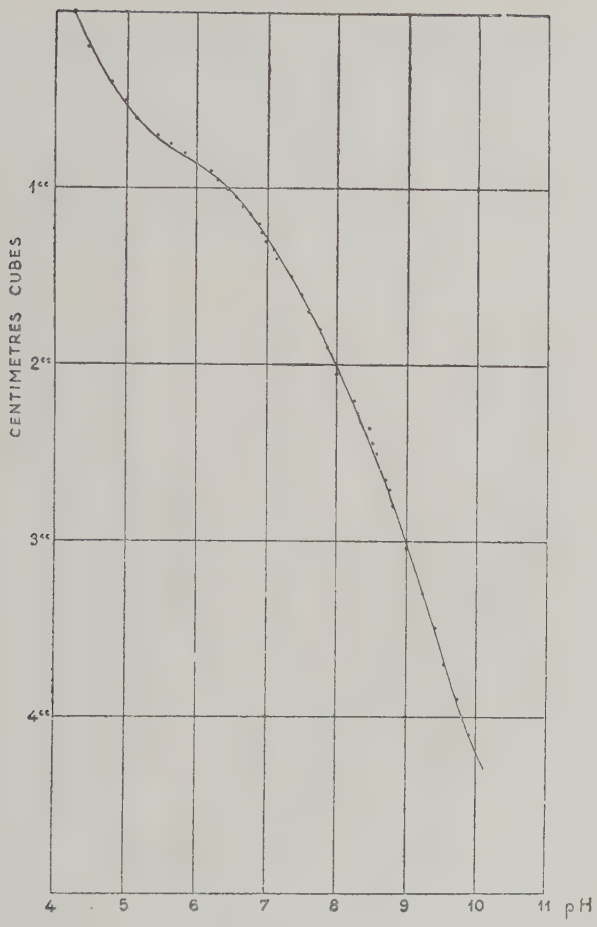

Fig. 1. — Courbe de neutralisation d'un bouillon bactériologique ordinaire.

2. **Résultats.**

Les courbes d'effet tampon ont été calculées d'après la relation: $t = \frac{\Delta q}{\Delta pH}$.

Nous avons étudié par cette technique trois milieux de culture: le bouillon ordinaire, le bouillon Martin et un milieu préparé suivant les données de Marbe et Olariu (83). Nous donnons dans la figure 2 les résultats obtenus.

Pour analyser ces courbes, nous pouvons distinguer trois zones dans la courbe de pouvoir tampon:

1° de pH 3 à pH 6, zone des pK acides des acides aminés et polypeptides. Dans cette zone les effets tampon des différents milieux ne sont pas très dissemblables. C'est dans cette région que précipitent certains constituants des milieux. L'opacification commence vers pH 4, 5, atteint un maximum vers pH 3, 5 et va en diminuant; vers pH 2, le milieu est de nouveau clair. Au point de vue de la précipitation, les 3 milieux étudiés se comportent de façon sensiblement analogue. Il doit y avoir là un point isoélectrique.

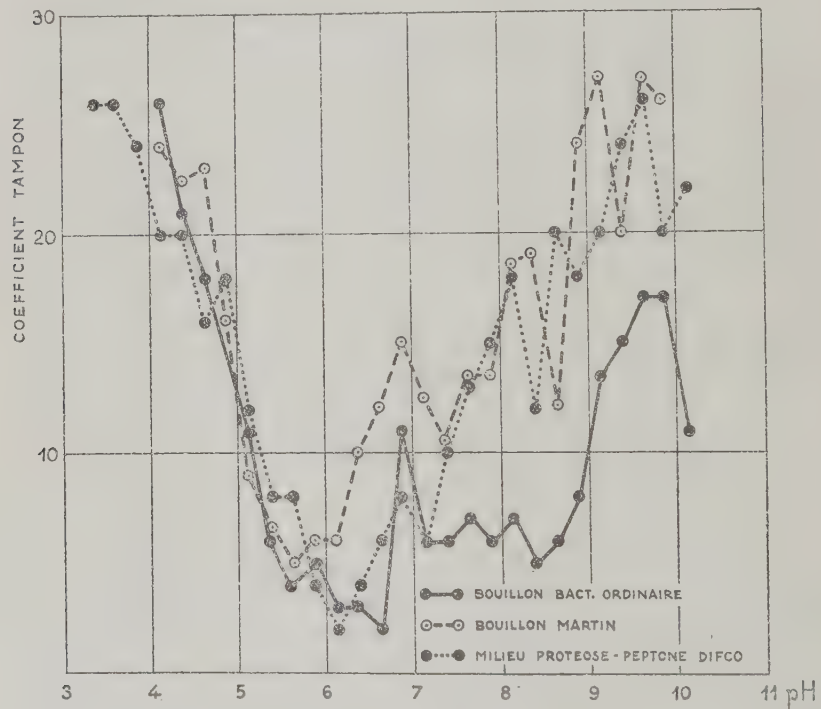

Fig. 2. — Comparaison des courbes d'effet tampon de 3 milieux de culture: Bouillon ordinaire, Bouillon Martin, Milieu à la protéose-peptone-Difco.

2° De pH 6 à pH 7, nous rencontrons les pK des phosphates et des carbonates: les premiers à pH 6,75, les seconds à pH 6,50. Les carbonates ne se manifestent pas sur la courbe des bouillons; par contre les phosphates font faire à la courbe un sommet net à pH 6,75. Remarquons que ces corps qui pourraient aisément servir de tampon pour maintenir la réaction à pH 7,5, ne semblent pas très abondants dans les milieux de culture. Eliminés par la filtration qui suit leur précipitation

à 110°, il n'en reste que trop peu pour qu'ils puisent exercer cette action tampon sur le milieu. Ils sont plus abondants dans le milieu Martin que dans les deux autres.

3° De pH 7 à pH 10, nous allons rencontrer des effets tampon dus uniquement aux pK basiques des acides aminés,

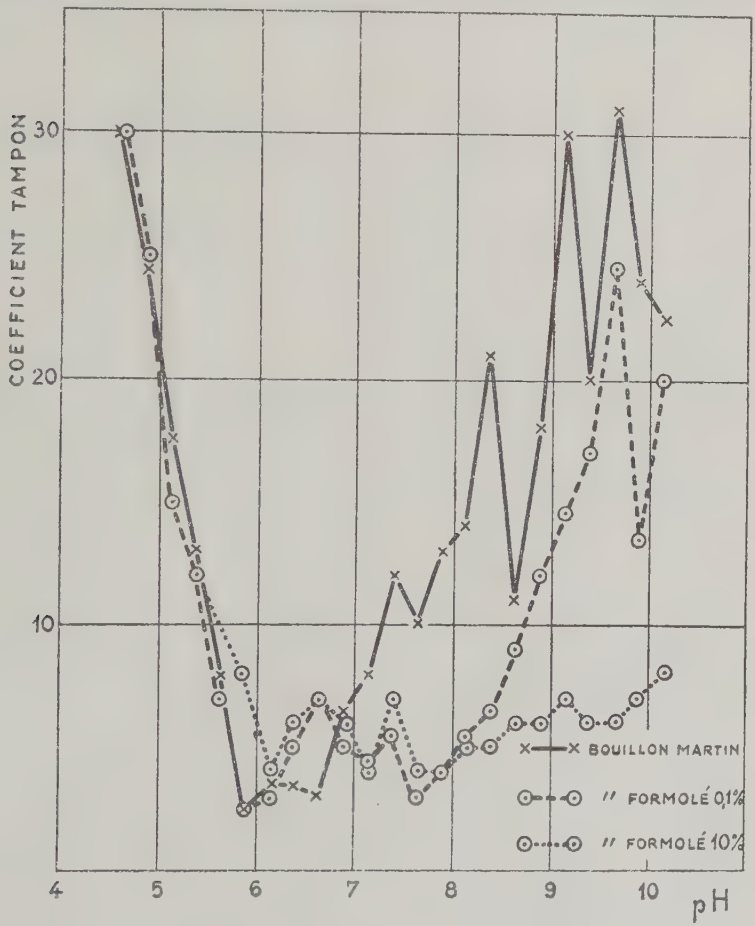

Fig. 3. — Action du formol à diverses concentrations sur la courbe d'effet tampon du Bouillon Martin.

peptones et polypeptides. Dans cette région, le pouvoir tampon du bouillon bactériologique est très faible; au contraire le milieu Martin et le milieu peptone protéose «Difco» nous montrent un pouvoir tampon élevé.

a) bouillon ordinaire montre un pK important vers pH 9,75; entre 7 et 9,75 le pouvoir tampon est faible.

b) bouillon Martin, pouvoir tampon élevé: 3 pK, l'un vers 8,50, l'autre 9,2, le troisième 9,65. Nous avons retrouvé ces 3 pK de façon constante dans les divers échantillons de bouillon Martin que nous avons eu de l'Institut Pasteur. Nous les retrouvons d'ailleurs dans la courbe de neutralisation de la toxine, mais le pK 8,50 disparaît généralement tandis que

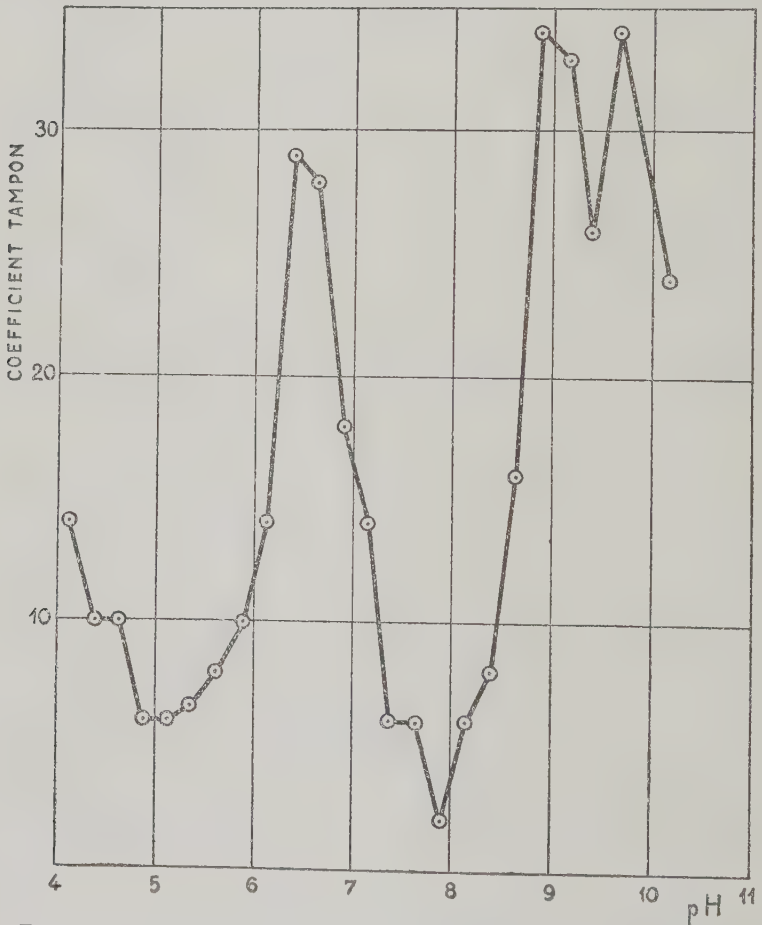

Fig. 4. — Courbe d'effet tampon du Bouillon toxine brut.

les pK 9,2 et 9,6 sont retrouvés toujours. Ces pK disparaissent lorsque l'on formole à 10 p. 100 le bouillon et par conséquent sont certainement dus au NH^2 des acides aminés et peptones (figure 3).

c) Le milieu peptone protéose «Difco» présente à peu près les mêmes caractères et les mêmes pK que le bouillon Martin.

En somme, dans ces 3 milieux les effets tampon importants ne peuvent être attribués qu'aux peptones. Ils sont beaucoup plus marqués pour le bouillon Martin et la protéose-peptone «Difco» que pour le bouillon ordinaire.

Si nous comparons maintenant les courbes de neutralisation du bouillon à celle de la toxine (fig. 4), nous voyons que les effets tampon constatés à 8,5 ou 7 ont disparu. Par contre, est apparue une grande pente d'effet tampon à 6,5 due aux carbonates.

Pour reprendre l'expression de H. J. Howard Bracn (17), nous voyons donc que la différence de comportement de ces milieux dans l'évolution du pH de la culture est due à la plus grande «réserve alcaline» des bouillons Martin et protéose-peptone par rapport au bouillon ordinaire. Dans ces milieux, le bacille va trouver une réserve suffisante pour fixer le Co^2 sous forme de bicarbonate qui, au fur et à mesure de son apparition, jouera le rôle de substance tampon.

Ainsi s'explique pour une part l'action des peptones du milieu. Cependant, dans le métabolisme du bacille sur les glucides, d'autres facteurs interviennent, apportés par la peptone, qui permettent l'utilisation et la dégradation complète des hydrates de carbone par le bacille diphtérique.

Nous aurons à en reparler au chapitre du rôle des facteurs chimiques.

3. Conclusions.

Nous avons donc vu que l'une des conditions nécessaire, mais non suffisante, pour obtenir une toxine active était que le pH final de la culture soit situé aux environs de 8.

Toutes les cultures dont le pH évolue vers l'acidité, donnent des bouillons peu toxiques.

Par contre, il arrive souvent, et nous en avons eu des exemples, que l'évolution du pH soit tout à fait normale et que cependant le bouillon ne soit pas actif du point de vue toxique.

Donc, quoique ayant une grosse importance, ce facteur n'est pas le seul à intervenir dans la production de la toxine dans les cultures.

L'aptitude des différents milieux généralement utilisés pour la fabrication de la toxine, nous semble devoir être rapportée en partie à leur plus grande réserve alcaline, fait que mettent bien en évidence nos expériences sur la courbe d'effet tampon de ces milieux de culture comparés d'une part au bouillon bactériologique ordinaire, d'autre part à la culture filtrée.

CHAPITRE II.

ROLE DU RAPPORT VOLUME/SURFACE.

Nous avons vu dans le chapitre précédent la grande importance de l'évolution du pH dans les cultures; mais nous savons aussi que ce facteur physico-chimique n'est certainement pas le seul à intervenir dans la production de toxine. Les autres facteurs sont beaucoup moins étudiés que lui.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'évolution dans les cultures du rH. D'autant plus que dans la technique recommandée pour obtenir un bouillon toxine riche, tous les auteurs ont mentionné l'importance d'un rapport volume sur surface déterminé, fait qui tend à faire penser que l'oxygénation de la culture doit jouer un rôle dans le développement de la toxine. Nous allons donc passer en revue les travaux se rapportant à ce rôle du rapport volume/surface.

C'est à Roux et Yersin que l'on doit cette amélioration de la technique. Ces auteurs, toujours dans l'idée de supprimer au maximum l'effet acidifiant de la fermentation des hydrates de carbone, utilisèrent des cultures faites sur une large surface dans les ballons de Fernbach. Ils obtinrent ainsi des résultats bien meilleurs et les perfectionnèrent encore en faisant passer sur la culture un courant d'air; l'aération de la culture se faisait après les 24 premières heures de la culture et était maintenue 4 à 5 jours. (Ils remarquèrent que l'aération trop prolongée donnait un produit moins toxique.) Ils pensaient qu'ainsi le bacille diphtérique poussait la dégradation des hydrates de carbone jusqu'à son stade ultime et que la combustion des acides n'était possible que dans ces conditions. Les résultats qu'ils obtinrent furent bons.

Beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de la surface du milieu en contact avec l'air. Signalons les travaux de Taylor (147), de Wadsworth (161), de Philippe et Loiseau (111bis) et de Siebmann (139).

La conclusion de ces auteurs est unanime et montre qu'il y a bien un rapport optimum volume: surface pour lequel la formation de toxine est maximum. Marbe, Antinescu,

Dimitrie et Stephanesco (81) ont montré que lorsqu'on augmente la surface de culture, le temps de maturation est raccourci.

Cependant une certaine épaisseur minimum de milieu est à respecter; lorsque l'on fait des cultures dans des ballons de Fernbach, la couche de liquide doit être de 1,5 à 2 cm. Dans ces conditions on observe la culture typique: le voile se développe en 24 heures, augmente d'épaisseur dans les deux jours suivants; puis au quatrième jour, se forment des lambeaux qui tombent au fond du vase, tandis que le voile se reforme en surface.

Si, au contraire, on emploie des récipients plus petits, bien que le rapport soit maintenu, la hauteur du liquide n'est pas suffisante et la culture présente un aspect anormal: les lambeaux ne se forment pas, la toxicité est plus basse qu'avec une culture faite dans les conditions classiques.

La conclusion de ces expériences est que probablement l'oxygénation de la culture intervient comme facteur important dans la formation de la toxine, mais l'explication de ces données empiriques est à peine ébauchée.

Pour y parvenir l'étude de la variation du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la culture semble particulièrement intéressante. Nous savons, en effet, que les actions diastasiques qui conditionnent l'activité métabolique des bacilles sont largement influencées par le potentiel d'oxydo-réduction auquel elles s'effectuent, celui-ci orientant une suite de réactions dans telle ou telle voie.

EVOLUTION DU rH DE LA CULTURE.

Dans un travail spécialement consacré à l'oxydo-réduction dans les milieux bactériologiques, Hewitt (60bis) a étudié la courbe de rH des cultures de bacille diphtérique dans diverses conditions: en aérobiose, en cultures aérées et en tubes scellés. Les courbes qu'il donne (figure 5), montrent une différence dans l'évolution du rH en aérobiose simple et lorsque l'on aère la culture. Nous reproduisons ci-dessous ces courbes. Au point de vue du rapport avec la toxicité, l'auteur insiste assez peu et signale simplement que la formation de toxine doit être plus forte lorsque le potentiel suit la courbe (1) que la courbe (2).

Les mesures de cet auteur sont faites dans des conditions qui ne sont pas les conditions habituelles de production de toxine:

1) la culture est faite dans des tubes et non en large surface,

2) le milieu employé ne contient pas de glucose et de maltose;

3) l'effet de l'aération est étudié par agitation de la culture ce qui empêche la formation du voile.

Ces mesures par conséquent ne peuvent pas nous permettre de tirer de conclusions sur l'influence du potentiel d'oxydo-réduction sur la production de toxine.

Nous avons repris ces expériences en mesurant le potentiel directement dans le milieu de culture à l'aide d'un fil de platine trempant dans une culture en ballon Fernbach; le milieu de culture était relié à l'électrode au calomel par un pont de gélose stérile. Les mesures ont été faites à 37°.

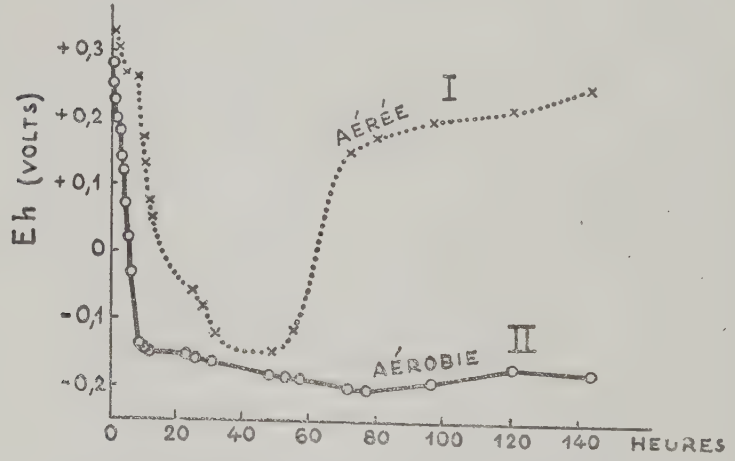

Fig. 5. — Courbe d'évolution du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures de Bacilles diphtériques. (D'après Hewitt.)

RESULTATS OBTENUS.

Dans ces conditions on obtient des potentiels très différents de ceux obtenus par Hewitt.

Première expérience. Culture du bacille «Toronto» sur milieu Martin + glucose (0,2 p. 100), maltose (0,6 p. 100), acétate de soude (1 p. 100), hauteur de culture 2 cm; avant ensemencement le potentiel est de —0,04 volts, le pH = 7,8; après 24 heures le potentiel est à —0,425 volts; dans les jours suivants, le potentiel se maintient à ce niveau, jusqu'au neuvième jour où il commence à remonter; la culture est

filtrée et dosée, à ce moment le pH final est de 8,5; elle tue le cobaye à la dose de 1/2000 de cm³ (figure 6).

Deuxième expérience. Culture de la souche «Toronto» sur milieu de Marbe et Olariu (+ glucose 0,2 p. 100, maltose 0,6 p. 100, acétate de soude 1 p. 100).

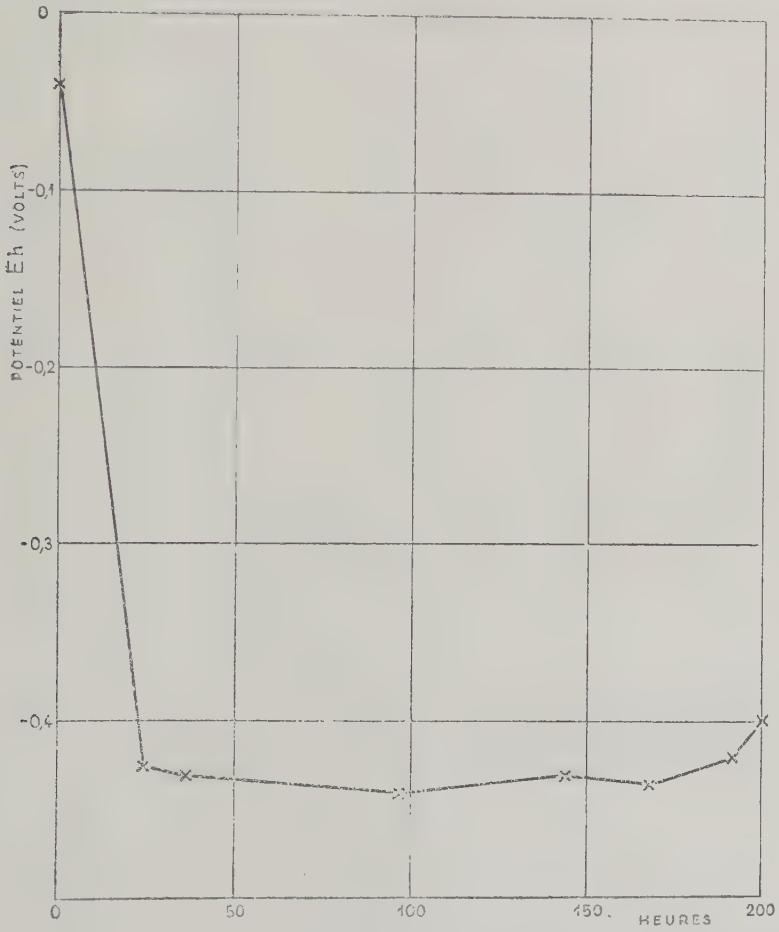

Fig. 6. — Evolution du potentiel d'oxydo-réduction dans une culture faite dans les conditions de production de la toxine diphtérique avec la souche «Toronto» sur milieu Martin. Filtration pendant la période réductrice. D. M. M.: 1/2000.

Le potentiel au départ est de —0,225 volts, le pH = 8.

La culture est tout à fait typique, il se fait un voile, puis des lambeaux.

Le potentiel après 24 heures tombe déjà à —0,390 volts et suit la courbe de la figure 7; à la 120e heure le potentiel remonte progressivement, la culture est filtrée le huitième jour, alors que le potentiel est —0,020 volts. Le filtrat ne tue le cobaye qu'à la dose de 1/20 cm³; le pH final est de 8,5.

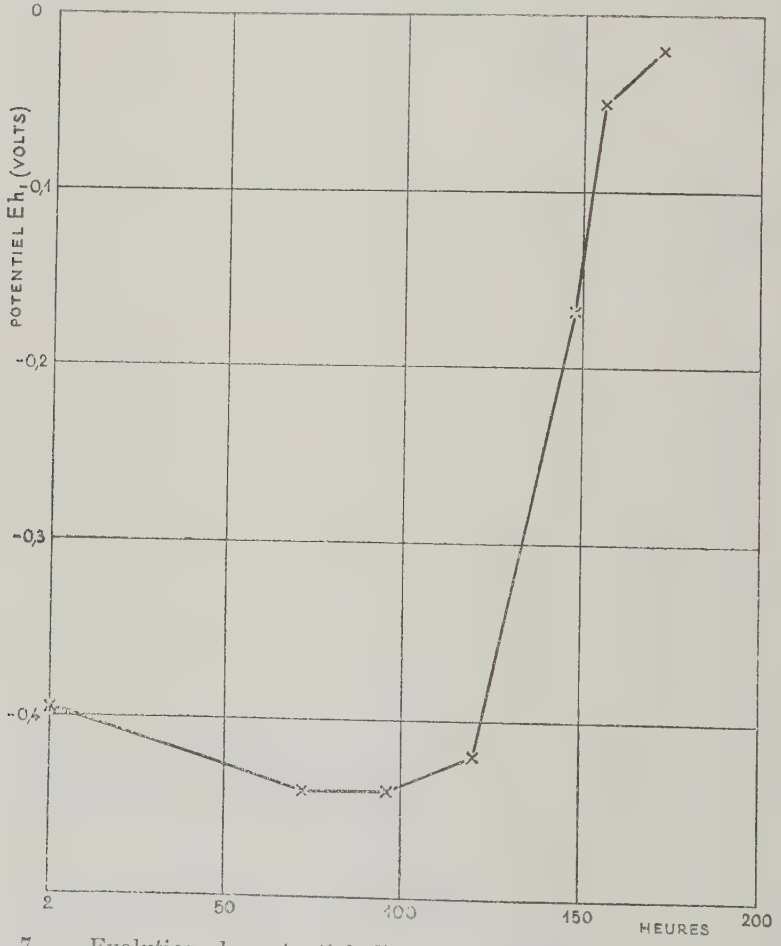

Fig. 7. — Evolution du potentiel d'oxydo-réduction d'une culture de la souche «Toronto» sur milieu de Marbe et Olariu. Filtration lorsque le potentiel de la culture est remonté à — 0,020 volts. D. M. M.: 1/20.

Troisième expérience. Culture de la souche «Toronto» sur milieu Martin, pas de sucres ni d'acétate; *Hauteur de culture* 0,75 *cm.* Il se fait un voile abondant, pas de lambeaux, le potentiel subit les variations indiquées dans la courbe de la figure 8, la toxicité de ce filtrat était 1/10 cm³; pH final 8,25.

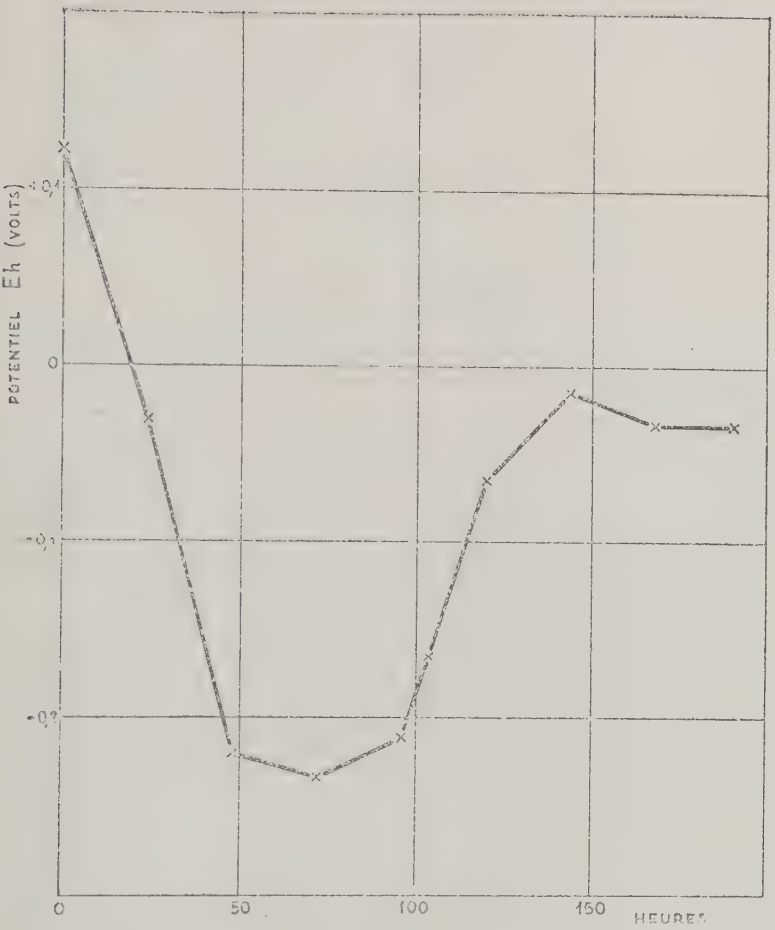

FIG. 8. — Evolution du potentiel d'oxydo-réduction d'une culture de la souche «Toronto» sur milieu Martin sans sucres, ni acétates. Epaisseur: 0,75 cm/D. M. M.: 1/10.

INTERPRETATION DES RESULTATS.

Ce qui frappe surtout dans ces expériences c'est que, dans une culture, faite en somme dans des conditions aérobies, le potentiel puisse se maintenir à un niveau extrêmement bas: en effet, étant donné les valeurs de pH, le rH calculé dans l'expérience I est de $rH \leqslant 2$, donc une valeur que l'on n'obtient que par anaérobiose.

D'autre part, les filtrats les plus toxiques sont obtenus lorsque la culture est filtrée alors que le rH est à ce niveau extrêmement bas (expérience 1).

Il semble donc que la toxine est libérée ou synthétisée par le bacille durant la phase réductrice et qu'elle se détruise lorsque le potentiel remonte en présence des bacilles (exp. II); destruction qui ne se produit pas lorsque cette remontée de potentiel se fait alors que les bacilles ont été séparés du milieu de culture par filtration (exp. I).

Lorsque le potentiel ne descend pas à ces valeurs basses (exp. III) la toxine est extrêmement peu active. Nous avons constaté ce fait plusieurs fois.

Il est facile d'interpréter la première partie de la courbe: la chute du potentiel dans les premières 24 heures, que l'on rencontre toujours, paraît due à la prolifération microbienne du bacille.

Pour que le potentiel se maintienne dans les jours suivants à un niveau aussi bas, il faut supposer que le bacille rejette constamment dans le milieu des corps réducteurs; il est vraisemblable que ces corps ne sont rien d'autre que les produits intermédiaires du métabolisme des hydrates de carbone. Le pouvoir réducteur des bouillons toxiques a déjà été signalé par Goldie (51).

Il y tout lieu de supposer que, lorsque le potentiel remonte à son niveau initial, le filtrat perd sa toxicité à cause de l'action des enzymes protéolytiques du bacille qui la détruisent, alors que ces enzymes étaient inhibées lorsque le potentiel était encore bas.

Dans des travaux en cours, nous nous attachons à démontrer ces deux hypothèses.

Comment dès lors expliquer le rôle apparemment contradictoire de l'oxygénation sur la formation de toxine? Comme l'a observé Hewitt (60bis p. 67) «une culture vigoureusement aérée peut être plus réductrice que la même culture faite dans des conditions ordinaires», cette aération augmentant la prolifération microbienne qui produit la réduction du milieu.

CHAPITRE III.

FACTEURS CHIMIQUES.

1. Culture sur milieux dépourvus d'albumoses et peptones.

Peu de temps après la découverte de la toxine diphtérique, différents auteurs se proposèrent comme but de recherche la culture en milieu chimiquement défini du bacille diphtérique. Ces expériences furent poursuivies dans le double but d'étudier les facteurs chimiques indispensables à la pousse du bacille et de rechercher à partir de quels éléments le bacille pouvait synthétiser la toxine.

Il y a lieu en effet de distinguer des facteurs favorisant la pousse microbienne et des facteurs qui, toutes choses égales au point de vue de la culture, augmentent la production de toxine.

Dans ces travaux, malheureusement, le poids de la récolte bacillaire est rarement mentionné, les auteurs se bornant à signaler la richesse de la culture en bacilles approximativement évaluée; aussi, bien souvent, on ne peut savoir exactement si l'addition d'un corps chimique agit en stimulant la pousse ou bien augmente la production de toxine directement.

L'influence des divers agents chimiques que nous allons passer en revue a été étudiée par leur adjonction tantôt à des milieux complexes, tantôt à des milieux chimiquement définis.

Les recherches ci-dessus mentionnées ayant montré l'importance du choix de la peptone dans la composition du milieu, c'est sur l'étude de ces corps complexes que se sont portées le plus grand nombre de recherches.

La présence des albumoses et des grosses molécules protéiques de la peptone est elle indispensable à la pousse et à la production de toxine?

Un grand nombre d'études poursuivies en France par Martin (85), Philippe et Loiseau (111bis), en Suède par Dernby et Walbum (35), en Angleterre par Davis (29), en Amérique par Wadsworth (160), etc... ont montré l'impossibilité de remplacer la peptone par des produits plus dégradés.

Tous ces auteurs, en effet, ont constaté que lors de la préparation de la peptone lorsque l'hydrolyse dépasse un certain degré, la pousse du bacille se fait à peu près normalement mais la toxine obtenue est d'un titre beaucoup plus faible.

Ces remarques avaient même conduit Dernby et Siwe (33, 34, 31) à conclure que la peptone était indispensable à la production de toxine. Pour eux, celle-ci dérivait d'une hydrolyse partielle des peptones par le bacille qui, poussée plus avant, aboutissait à la destruction du pouvoir toxique. Comme arguments, ils se basent sur les constatations suivantes: 1) l'azote aminé libre augmente en même temps que le pouvoir toxique; 2) un extrait chloroformique des bacilles mis en présence de peptone fait apparaître une certaine toxicité.

Wadsworth et Wheeler (160), essayant d'isoler chimiquement la partie active des peptones, virent que c'est dans les fractions à grosses molécules que l'on retrouve le plus d'action sur la toxinogénèse.

Par contre Robinson et Rettger (126bis) obtiennent de bons résultats avec un produit commercial: l'opsine, qui est obtenue par digestion trypsique de diverses albumines, mais n'obtiennent aucun résultat avec des hydrolysats trypsiques de caséine, lactalbumine et édestine

David et Dernby (27) en 1921 proposèrent un milieu à base de levure avec lequel ils notèrent l'action favorable d'une digestion trypsique.

Quinochet (119) en 1892 avait déjà montré que l'on peut obtenir la pousse du bacille et une production appréciable de toxine sur de l'urine débarrassée de protides.

Plus récemment, Wadsworth, Wheeler et Mendez (162) ont montré que l'on peut obtenir une toxine active et un bon développement microbien sur un liquide sans albumine obtenu par dialyse à travers cellophane du milieu peptoné habituel (peptone protéose Difco + NaCl...).

Les derniers travaux de A. M. Pappenheimer et Johnson S. J. (107) enfin, qui utilisent avec succès un hydrolysat de gélatine auquel ils ajoutent des extraits (exempts de protides) de foie, permettent la même conclusion.

La question est à l'heure actuelle résolue et il ne fait pas de doute qu'on puisse obtenir des bouillons très toxiques sur des milieux dans la composition desquels ne subsistent que des protides de faible poids moléculaire.

Les résultats contradictoires doivent être le résultat de la difficulté avec laquelle les souches de collection s'habituent

à ces milieux. Il y a là encore un point obscur relaté par tous les auteurs qui se sont occupés de cette question.

2. Rôle des acides aminés.

Comme il fallait s'y attendre la source d'azote nécessaire aux synthèses protéiques du bacille peut être apportée par des acides aminés. Les résultats obtenus avec les milieux synthétiques viennent le confirmer.

Le premier auteur qui ait pu cultiver le bacille diphtérique sur milieu chimiquement défini fut Utschinsky (150) en 1893.

Son milieu était composé des corps suivants:

eau distillée	1.000 g.
glycérine	30 g.
chlorure de sodium	5 g.
chlorure de calcium	0,1 g.
sulfate de magnésium	0,2 g.
phosphate bipotassique	2 g.
lactate d'ammonium	6 g.
asparagine	3 g.

La culture n'était mortelle pour le cobaye qu'à condition d'inoculer plusieurs centimètres cubes.

Hugounenco et Doyon (66), puis Fraenckel ne purent reproduire ces résultats.

Hadley (54) employant un milieu composé des mêmes constituants que le milieu de Utschinsky mais où l'asparagine est remplacée par du glycocolle, obtint une culture qui avait une toxicité du même ordre que celle d'Utschinsky.

Gordon, Gallimard et Lacomme (48), Koser et Rettger (71), Davis et Ferry, Braun et d'autres auteurs encore, ne parvinrent pas en employant ces milieux à obtenir la pousse du bacille diphtérique.

Wadsworth (160) en 1928 reprend systématiquement ces recherches. Il étudie le milieu d'Utschinsky, le milieu de Hadley et le milieu que Armand Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine (36) avaient mis au point pour l'étude du bacille tuberculeux. Il obtint une fois, au cours de nombreux essais, un résultat positif mais la culture ainsi obtenue avait perdu tous ses caractères biochimiques et immunologiques et ne donnait pas de toxine.

Nous avons essayé de cultiver Am 8 sur les milieux de Hadley et Utschinsky sans résultat.

En 1929, Braun, Hofmeyer et Mundel (19), obtiennent sur le milieu suivant:

eau distillée	1.000 g.
chlorure de sodium	5 g.
sulfate de magnésium	0,2 g.
chlorure de calcium	0,1 g.
phosphate monosodique	1 g.
phosphate disodique	1 g.
acétate de soude	5 g.
asparaginate de soude	5 g.
cystine	0,15 g.
glucose	2 g.

des résultats positifs; la culture n'est pas très riche en principe actif. Ces auteurs notent que la culture en milieu synthétique exige notamment la présence de cystine et mettent en relief un fait très important: l'impossibilité, pour les souches de collection servant habituellement à la fabrication de la toxine, de pousser sur ce milieu, alors que des souches récemment isolées de l'organisme y poussent assez facilement.

En 1930, Mary M. Maver (86) démontre aussi ce fait en essayant, sur le milieu de Braun, 6 souches différentes; seules les souches de collection ne poussent pas.

En 1933, Ehrismann, d'une part, et Schmidt, de l'autre, vérifient les conclusions de l'auteur et recommandent l'adjonction de cystine au milieu.

En 1934, Wadsworth et Wheeler (161) publient les résultats qu'ils ont obtenus sur un milieu analogue à celui de Braun, à base d'asparaginate de soude et de cystine. Ils insistent sur le rôle du calcium dans la composition du milieu et notent qu'ils n'ont pu obtenir de résultats positifs qu'avec des souches qu'ils ont adaptées à la pousse sur leur milieu. Cette souche, après un an de passages successifs en milieu synthétique, fournissait un bouillon toxine dont la dose mortelle pour le cobaye était de 1 cm³.

Des progrès intéressants ont été réalisés par les recherches de J. Howard-Mueller (93-94) et ses collaborateurs. Ces auteurs, par fractionnements successifs des substances stimulantes contenues dans un extrait de foie, sont arrivés à montrer le rôle de trois facteurs importants: l'acide nicotinique, l'acide pimélique et la β alanine. Pappenheimer, Mueller et Cohen (105) obtiennent ainsi sur milieu synthétique une pousse abondante et une production de toxine sensiblement égale à celles observées sur milieu ordinaire (36 Lf par cm³

et D.M.M.: 1 (1934 cm³) dans ce but milieu ne contient que 0,7 mg. d'azote par cm³. Le milieu de ces auteurs est composé comme suit: glycocolle 0,5 g., dl valine 1 g., dl leucine 0,5 g., acide dl glutamique 5 g., dl méthionine 0,20 g., l tyrosine 0,100 g., NaCl 5 g., Po^4HK^2 2 g., pour 500 cm³ d'eau. On ajoute: 0,200 g. de l cystine, 1 mg. d'acide pimélique, 1 mg de β alanine, 2 mg. d'acide nicotinique, le tout ajusté à pH = 7,8. On ajoute 0,33 cm³ d'une solution à 33 p. 100 de $CaCl^2$, bouillir, filtrer, ajouter 0,3 g. So^4Mg., 0,005 g. So^4Cu et 100 mg. de l tryptophane. Ramener le volume à 1 litre. Stériliser à l'autoclave. Avant usage, on rajoute 2 cm³ p. 100 cm³ de la solution stérile suivante:

lactate de soude Merk 31 p. 100, glucose Merk 7,5 p. 100, maltose purifié 15 p. 100, chlorure de calcium 0,3 p. 100.

En 1938, Koser et Rettger (72), reprenant ces expériences montrent que la β alanine seule est indispensable à la pousse, que l'acide nicotinique et l'acide pimélique n'ont qu'une action favorisante.

Discussion.

Pour résumer ces diverses études, il semble à l'heure actuelle qu'une toxine puissante puisse être obtenue sur un milieu synthétique relativement simple.

Ces études ont montré plusieurs faits assez curieux:

1° la pousse sur milieu synthétique, positive avec certaines souches récemment isolées et adaptées à la culture en milieu synthétique, ne réussit pas lorsque l'on emploie les souches de collection ordinairement utilisées dans la fabrication de la toxine, ce qui semble indiquer que les besoins en facteurs de croissance ne soient pas les mêmes pour toutes les souches.

2° l'importance de corps de composition très simple tel la β alanine comme facteurs de croissance. Ce fait est à rapprocher des anciennes constatations de G. Schaeffer (130-131) sur le rôle de la carnosine comme facteur de croissance. A l'époque où travaillait Utschinsky, les corps chimiques n'étant pas isolés avec le degré de pureté obtenu de nos jours, de faibles quantités d'un de ces facteurs de croissance pouvaient se trouver dans les corps azotés employés par lui et l'on peut s'expliquer ainsi que des résultats positifs aient été obtenus qui furent ensuite niés par d'autres.

3° les facteurs favorisant la pousse donnent une plus grande toxicité. On n'a pas pu mettre en évidence un corps

azoté dont la présence est liée à la fabrication de la toxine; dès lors on peut répondre à la question que se posaient Abt et Loiseau (3) en 1922: «la toxine est-elle un produit de sécrétion ou d'excrétion du microbe, résultat fatal de la vie microbienne, quel que soit l'élément offert? Ou bien tire-t-elle son origine d'un élément du milieu que le bacille amène à un stade déterminé de désintégration?»

D'après les recherches modernes la formation de toxine ne semble pas due à la désintégration des protides par le bacille, mais bien plutôt être le résultat, soit de la vie puis de la mort du bacille, soit d'une synthèse à partir des acides aminés.

4° il est intéressant de noter qu'un ou deux acides aminés suffisent au développement du bacille et que leur nature peut être quelconque (la présence de cystine obligatoire mise à part): Wadsworth emploie comme source d'azote l'asparaginate de soude, Hadley le glycocolle, Utschinsky l'asparaginate de soude, Braun et Hofmeyer, Mary M. Maver, le succinate d'ammoniaque et le glycocolle.

Mais divers auteurs, en particulier Mary M. Maver (86), ont montré que l'addition d'acides aminés à un milieu de base simple, sans être indispensable, exerce cependant un rôle favorisant.

Le milieu de Pappenheimer contient une longue liste d'acides aminés dont tous ne sont certainement pas indispensables, mais sont placés là à un titre favorisant.

Pour certaines cultures, une trop forte proportion d'acides aminés entraîne une inhibition de la production de toxine.

L. Sivori et G. Mannuti (142), d'une part, Sbarsky et Soubkowa (129), d'autre part, ont montré l'action neutralisante de certains acides aminés, en particulier la tyrosine, sur la toxine diphtérique brute.

Gibbs et Rettger montrent que 1 g. p. 100 de cystine exerce une action inhibitrice, de même que le tryptophane, favorisant en petite quantité, exerce une action défavorable en trop grande quantité.

Watson et Wallace (168-169) montrent l'influence inhibitrice d'une trop grande quantité d'azote aminé.

Peut-être faut-il trouver dans des expériences de ce genre l'explication des faits constatés par les divers auteurs sur l'action inhibitrice des peptones hydrolysées à un trop haut degré.

Les acides aminés à concentration définie exercent donc une action favorisante, mais non indispensable, sur la pousse du bacille diphtérique; cette action présente un optimum.

Cependant il semble démontré à l'heure actuelle que deux acides aminés ont une place à part et jouent un rôle primordial dans le développement microbien et la production de toxine.

Ce sont la cystine et la β alanine.

Ces deux corps agissent à des concentrations différentes. Alors que la dose optima du premier est de 0,5 g. p. 1000, 1 mg. par litre du second serait effectif.

Le mode d'action de ces deux corps n'est pas comparable.

a) *Rôle de la cystine.*

Le rôle de cet acide a été démontré par Braun et Mündel (20), contrôlé ensuite par Mary M. Maver (86) et Ehrisman, Schmidt, Wadsworth (161), G. et I. Scheef, Hida et Suzuki, etc.

Pour certains, la cystine aurait un rôle uniquement dans la production de toxine (G. et I. Scheef (132); pour d'autres (Hida et Suzuki) (62) la cystine ne contribue à la production de la toxine que par son action sur le développement microbien à la dose de 0,05 g. p. 100 G. et I. Scheef, à la dose de 0,01 g. p. 100, remarquent une production de toxine double. Ils attribuent à leur teneur élevée en ce corps le fait que la peptone Difco et la peptone de Witte conviennent mieux que les autres à la production de la toxine. Etudiant de plus près l'action de ce corps, ils constatent que, sous sa forme réduite (cystéine), l'action est inverse. Ils démontrent que l'action de la cystine n'est pas due simplement à un apport de soufre en montrant que la méthionine n'a pas d'action sur la toxinogénèse; le gluthation réduit à les mêmes effets que la cystéine, à l'état oxydé il se comporte comme la cystine.

Locke et Main (76) avaient montré l'action inhibante de la cystéine.

La conclusion de Braun et Mündel (20) sur l'action de la cystine est la suivante: «on doit admettre que, dans le métabolisme du bacille diphtérique, les processus de réduction ont une signification particulière et pour leur multiplication les milieux de culture doivent avoir un potentiel d'oxydo-réduction déterminé»; la cystine intervient donc de façon toute spéciale dans le métabolisme du bacille diphtérique. Son action favorisante ne peut pas être due uniquement à l'apport de soufre, il est possible qu'elle agisse sur l'activité méta-

bolique du bacille alors que la cystéine bloquerait certains enzymes.

b) *Rôle de la β alanine.*

Le rôle de la β alanine, beaucoup moins étudié que celui de la cystine parce que découvert depuis peu de temps, n'est pas non plus un rôle nutritif.

Etant donnée l'infinitésimale quantité de ce corps qui suffit à exciter la croissance, KNIGHT, PAPPENHEIMER, KOSER (72) et LWOFF (78bis) le considèrent comme un facteur de croissance et comme l'un des constituants du mystérieux «bios» de la levure.

Conclusions.

La source d'azote nécessaire aux synthèses bacillaires peut être apportée par les acides aminés.

Au point de vue plastique la source d'azote aminé peut être quelconque.

Deux acides aminés indispensables à la culture ont une place à part; la cystine et la β alanine.

La cystine a une action encore mal déterminée dans le métabolisme de synthèse du bacille.

La β alanine est considérée comme un facteur de croissance.

3. **Le rôle des facteurs accessoires de croissance.**

Outre la β alanine que l'on peut considérer comme un facteur indispensable de croissance H. MUELLER et ses collaborateurs ont isolé deux corps: l'acide pimélique et l'acide nicotinique qui, pour le bacille diphtérique sont des facteurs accessoires de croissance.

a) *L'acide nicotinique.*

Son rôle a été découvert par KNIGHT en 1937 sur la culture de Staphylocoque doré. Indispensable pour certains germes, il n'est que stimulant pour la culture du bacille diphtérique.

LWOFF, au Congrès des Microbiologistes de langue française, note que l'action physiologique de ce corps n'est pas encore établie, mais qu'il y a lieu de la rapprocher de celle du facteur V qu'il a étudié et identifié en 1936 au phosphopirimidine-nucléotide (78), étant donnée la parenté chimique de sa formule avec celle de l'adénine.

b) *L'acide pimélique.*

C'est aussi un stimulant, découvert par J. HOWARD MUELLER (93), dont l'action physiologique est encore mysté-

rieuse. L'auteur montre en effet que, parmi les acides dibasiques, seul l'acide pimélique possède cette action.

4. Rôle des facteurs salins.

Les expériences classiques de Raulin et Gabriel Bertrand sur l'influence exercée par des traces de divers sels sur les cultures, ont conduit certains auteurs à examiner leur action sur le développement du bacille diphtérique

a) Les *sels de manganèse*, étudiés par Walbum (163), exercent, d'après cet auteur, une énorme influence sur la production de toxine, à tel point que celle-ci peut être doublée par l'adjonction d'une petite quantité de sel de manganèse au milieu de culture. Au contraire, Locke et Main (77) trouvent qu'ils ont une action inhibitrice.

b) Le rôle des *sels de calcium* a surtout attiré l'attention de Wadsworth et Wheeler (160-161). Ces auteurs montrent:

1° que la teneur en calcium des peptones aptes à la production de toxine est plus forte que la teneur en ce même sel des autres peptones;

2° que l'on augmente le rendement en toxine en ajoutant du calcium à des peptones qui en sont pauvres;

3° que les sels de calcium et la peptone doivent être stérilisés ensemble; si alors on supprime le calcium en le précipitant sous forme d'oxalate, la peptone reste cependant apte à produire de la toxine, alors que si cette précipitation est faite avant la stérilisation, la peptone n'est pas favorable.

La conclusion de cet auteur est que les sels de calcium agiraient peut-être de façon analogue à celle suivant laquelle ils agissent dans la coagulation du sang. Il pense que le calcium pourrait servir de cocatalyseur à une réaction enzymatique du bacille. Cette conception n'a pas été vérifiée davantage dans l'ignorance où nous sommes des réactions enzymatiques du bacille diphtérique.

c) Le rôle des *sels de cuivre et de fer* a également été très étudié.

En 1930, Locke et Main (77) montrent qu'en éliminant le cuivre du milieu de culture on diminue la toxicité sans influencer la croissance du microbe; le milieu recouvre sa puissance par addition de sulfate de cuivre; le fer aurait une action inhibitrice nette.

Pour G. Pope (112), sur son milieu semi-synthétique à base de peptones, l'addition de 0,5 mg. de fer et de 2,5 mg.

de cuivre augmente la production de toxine. La phase acide de la culture est diminuée par l'addition du fer. A concentration plus élevée, le fer serait défavorable à la culture.

Pour G. et I. Scheef (132), les sels de cuivre à l'état de traces augmenteraient la pousse microbienne, tandis que l'effet inverse serait produit par les sels de fer.

Pappenheimer insiste aussi sur le rôle du cuivre comme favorisant et sur l'action inhibitrice du fer.

Bordet, au Congrès de Microbiologie de langue française, rapporte qu'il a constaté le rôle favorisant du sulfate ferreux à petites doses (une goutte d'une solution à 5 p. 1000 pour 5 cm^3); il pense que le rôle de ce sel serait un rôle sur la respiration du bacille.

L'action des sels de cuivre et de fer sur le pouvoir réducteur des bouillons a été étudié par R. A. Q. Meara (89) qui a montré que des traces de fer augmentaient le potentiel d'oxydo-réduction alors que le cuivre provoque une diminution.

Pour Locke et Main et pour G. et I. Scheef, l'action inhibitrice du fer et favorisante du cuivre serait due à leur action sur le potentiel d'oxydo-réduction.

5. Rôle des substances ternaires.

a) *Glucides.*

Le rôle des sucres a été très étudié.

Jugés d'abord nuisibles à la formation de la toxine, ils sont aujourd'hui employés dans tous les laboratoires.

La fermentation du glucose entraîne, comme nous l'avons vu plus haut une acidification du milieu nuisible à la formation de la toxine. Si l'on empêche, par l'emploi de peptones à fort pouvoir tampon, cette acidification de trop se manifester, le glucose exerce, au contraire, une action favorable.

Hitchens (64) préconise l'emploi du glucose, ainsi que Th. Smith (111bis) qui emploie une culture fermentée par le bacille coli, stérilisée à 100 degrés, à laquelle il ajoute 2 p. 1000 de glucose.

En 1929, Ramon (122) recommande l'addition de glucose à 2 p. 1000 et de l'acétate de soude (10 g. par litre).

Pope et Healey (114) montrent l'avantage du maltose à 0,4 p. 100.

Marpe, Dimitriu et Stephanesco (82) préconisent l'emploi de ces deux sucres auxquels ils adjoignent de l'acétate de soude.

Puis Philippe et Loiseau (111bis) les emploient à l'Institut Pasteur de Paris et reconnaissent leur action favorisante.

Taylor (147) fait les mêmes observations.

Wadsworth (160), dans une étude détaillée, précise la quantité juste nécessaire du glucose et du maltose qui donne le meilleur rendement en toxine; il trouve que les doses optima sont de 0,2 p. 100 de glucose et 0,6 p. 100 de maltose.

Dans un rapport au Congrès de Microbiologie de langue française, Bordet (16 et 16bis), faisant une analyse du rôle et de l'utilisation des glucides par le bacille diphtérique en rapport avec la production de toxine, est d'avis que le glucose et le maltose sont favorisants, mais que, pour que ces corps soient utilisés, il faut que le milieu contienne certaines substances, qu'il classe dans les facteurs de croissance, présentes dans la levure de bière. Ces facteurs, qui seraient en quantité trop irrégulièrement suffisantes dans les bouillons ordinaires, seraient nécessaires à l'utilisation des sucres.

Dans la réaction de fermentation du glucose et du maltose, pour éviter la formation d'une trop grande acidité, outre l'emploi de régulateurs de réaction tel que l'acétate de soude, il y aurait donc, d'après cet auteur, intérêt à utiliser la levure de bière. C'est la conclusion à laquelle arrive aussi Mustapha A. (95).

b) *Acétate de soude.*

Ramon en 1929 recommande l'emploi de l'acétate de soude comme «régulateur de réaction» et en effet son adjonction aux milieux glucosés permet d'obtenir une stabilisation du pH et des filtrats plus toxiques que dans les milieux glucosés qui en sont dépourvus.

Est-ce que ce sel est utilisé comme source énergétique par le bacille? Bordet (16 bis) pense que oui, mais cet auteur n'en donne pas la preuve directe.

On peut se rendre compte par la courbe d'effet tampon que ce sel est en effet en grande partie utilisé; l'acétate de soude, aux doses employées: (10 g. par litre) donne un effet tampon représenté figure 9.

Or nous ne retrouvons pas cet effet tampon sur les courbes de toxine brute (figure 1). Il a donc disparu du milieu et a contribué à former des carbonates.

Le rôle de «régulateur de réaction» de l'acétate de soude est donc dû à son utilisation par le bacille.

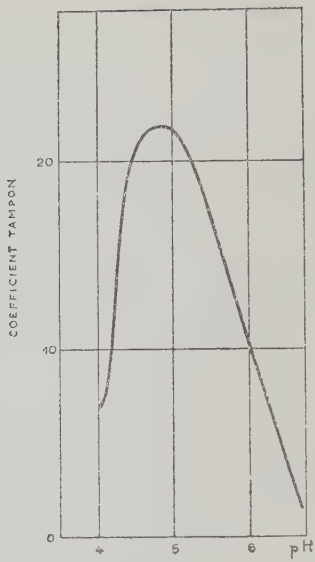

Fig. 9. — Courbe d'effet tampon d'une solution d'acétate de soude à 10 p. 1.000.

c) *Lactate de soude.*

Certains auteurs, en particulier Wadsworth, Pappenheimer etc, utilisent de préférence le lactate de soude comme régulateur de réaction. Il est probable que ce corps est utilisé de la même façon que l'acétate de soude.

6. Expériences personnelles.

Nous avons fait d'assez nombreux essais sur les «besoins chimiques» du bacille diphtérique. Malheureusement, ils n'ont été que peu fructueux. Nous attribuons nos échecs au manque d'adaptation des souches que nous avions à l'époque.

Nous nous sommes servis de trois souches:

1° la souche AMP de l'Institut Pasteur qui nous a été obligeamment prêtée par MM. Philippe et Loiseau que nous tenons à remercier ici.

Cette souche cultivée sur bouillon Martin (+ glucose, maltose, acétate) nous a donné une toxine titrant 2000 D.M.M.

Cultivée sur le milieu recommandé par Marbe et Olariu, cette souche ne poussait pas. Il était nécessaire pour obtenir une belle culture d'ajouter un peu de macération de viande. Mais la toxine produite tuait à peine à 1/100. Sur milieu synthétique de Pappenheimer, cette souche ne donna pas de développement.

2° et 3°. Les souches «Allen» et «Toronto», qui nous ont été envoyées grâce à l'amabilité de M. Howard-Mueller.

Au contraire de la première, ces deux souches donnaient une belle culture sur le milieu peptoné sans addition de macération de viande. Mais le pouvoir toxique était très faible (1/100). L'addition au milieu peptoné de levure de bière amena la toxicité à 1/200. Nous n'avons pu encore déterminer pour quelle raison ces cultures, malgré une pousse normale et des conditions de culture strictement observées, n'étaient pas plus toxiques.

Sur milieu Martin (+ glucose, maltose, acétate) la souche «Toronto» nous a donné une toxine tuant à 1/2000.

Sur milieu synthétique ces souches ne se sont pas développées, mais ce fait n'est pas étonnant car nous n'avons pas prolongé suffisamment les expériences d'adaptation au milieu synthétique. Nous n'avons fait que trois passages de la souche Allen sur le milieu de Pappenheimer et la pousse était très faible. L'addition au milieu peptoné (Difco) des facteurs de croissance ci-dessus mentionnés (β alanine, acide nicotinique, acide pimélique) n'augmenta pas sensiblement la pousse du bacille; au point de vue toxicité les résultats ne furent pas meilleurs.

Nous étudions en ce moment d'autres souches récemment isolées dans notre Institut que nous cherchons à adapter à ces milieux.

Conclusions.

L'un des facteurs qui nous semble être primordial pour l'étude des conditions chimiques du développement du bacille diphtérique est l'adaptation du microbe, par de nombreux passages sur le milieu que l'on veut étudier. Malgré les résultats acquis à l'heure actuelle bien des inconnues sont encore à résoudre. Une étude plus approfondie du potentiel d'oxydo-réduction nous semble devoir être riche de résultats quant à l'étude du métabolisme du bacille et devoir donner des renseignements précieux sur le rôle des facteurs chimiques que nous venons de passer en revue.

C'est ainsi que doivent agir par action sur l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction de la culture:

les sels de cuivre,

le rôle inhibant de la cystéine,

les produits du métabolisme des sucres.

Nous poursuivons actuellement nos recherches dans ce sens.

DEUXIEME PARTIE.

CHAPITRE PREMIER.

ETUDE DU BOUILLON TOXINE PAR LA COURBE DE NEUTRALISATION ET D'EFFET TAMPON.

Nous avons étudié la courbe de neutralisation et d'effet tampon de la toxine brute soit directement, soit après chauffage à 60° pendant une heure, soit après addition d'antitoxine, soit enfin après traitement au formol.

Dans ces expériences la technique employée fut la même que celle décrite à propos de l'étude similaire des bouillons de culture.

Nous avons étudié plus de 15 échantillons de toxine brute par la courbe de neutralisation. Ces échantillons, qui nous ont été fournis par l'Institut Pasteur, nous ont donné des courbes qui au point de vue qualitatif sont assez comparables. Cependant, au point de vue quantitatif, dans certains échantillons nous avons été obligés de neutraliser avec des réactifs n/10 le produit dilué au 1/5e, alors qu'avec d'autres échantillons nous avons neutralisé avec les mêmes réactifs le produit dilué au 1/10e.

1. Courbe de neutralisation du bouillon toxine brut.

La courbe de neutralisation de la toxine brute présente à 6,5 un grand sommet dû aux bicarbonates qui ont pris naissance dans le milieu et que nous avons signalé à propos de l'étude des bouillons.

Les effets tampon dans la région acide offrent une assez grande similitude avec ceux du bouillon; par contre, vers 7,5 ou 8, de nombreux sommets ont disparu. On voit persister, mais pas toujours, les effets tampon à 8,5; par contre les 2 pK à 9,2 et à 9,50, rencontrés dans le bouillon, sont retrouvés avec une grande régularité dans les bouillons toxines.

Dans la figure 10, nous donnons un exemple de ces courbes de neutralisation de bouillon toxine.

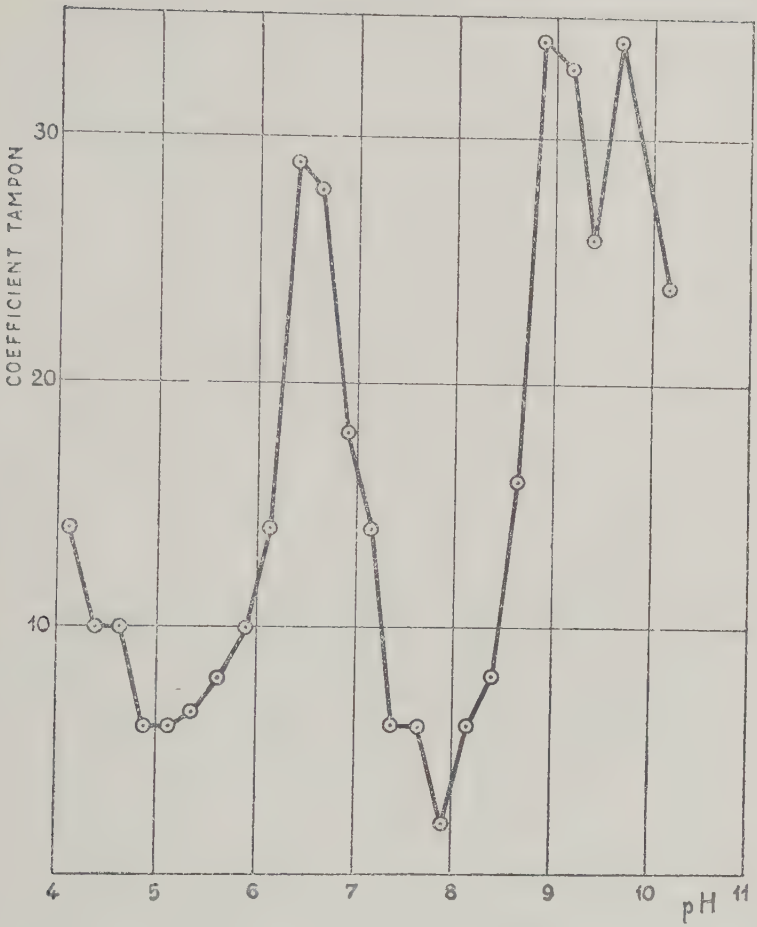

Fig. 10. — Courbe d'effet tampon du Bouillon toxine brut.

Dans la figure 11 nous avons fait la courbe de neutralisation en la commençant à pH 3 et en retournant vers l'alcalinité. Dans ces conditions, on voit disparaître le sommet 6,5; ceci nous prouve donc que ce sommet était bien dû aux bi-carbonates qui ont été transformés en Co2 par l'acidification et rejetés au dehors. Sur cette même figure on voit, avec plus de netteté que sur la figure précédente, la disparition des pK situés entre pH 7 et pH 9. L'interprétation des pK 9,2 et 9,65 est un peu délicate. Nous trouvons en effet, dans la liste des acides aminés, un assez grand nombre de corps ayant leur pK à ces pH. Cependant ce sont surtout les acides à chaine droite, courte qui ont leur pK à ces niveaux.

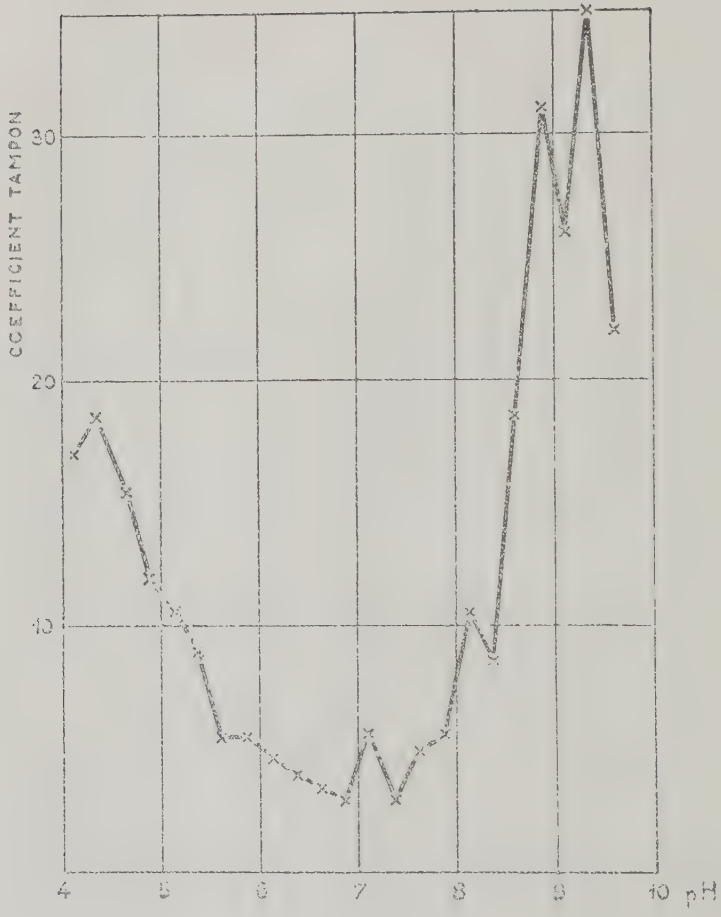

Fig. 11. — Courbe d'effet tampon du Bouillon toxine brut. Début de la courbe en région acide: disparition du sommet dû aux bicarbonates à pH: 6.5.

2. Bouillon toxine chauffé.

Nous avons recherché les modifications qu'apporte à la courbe de neutralisation un chauffage à 60° pendant une heure en tube scellé.

Les modifications portent surtout sur les pK de la zone alcaline. Dans les courbes les plus typiques, on constate une fusion des deux sommets pH 9,2 et pH 9,65 et la formation d'un seul sommet à pH 9,5. Le reste de la courbe de neutralisation présente de petites différences difficiles à interpréter.

Sur la figure 12 nous donnons une de nos courbes de bouillon toxine chauffé à 69°, 1 heure, comparé avec le même non chauffé.

Cette toxine n'était plus toxique pour le cobaye.

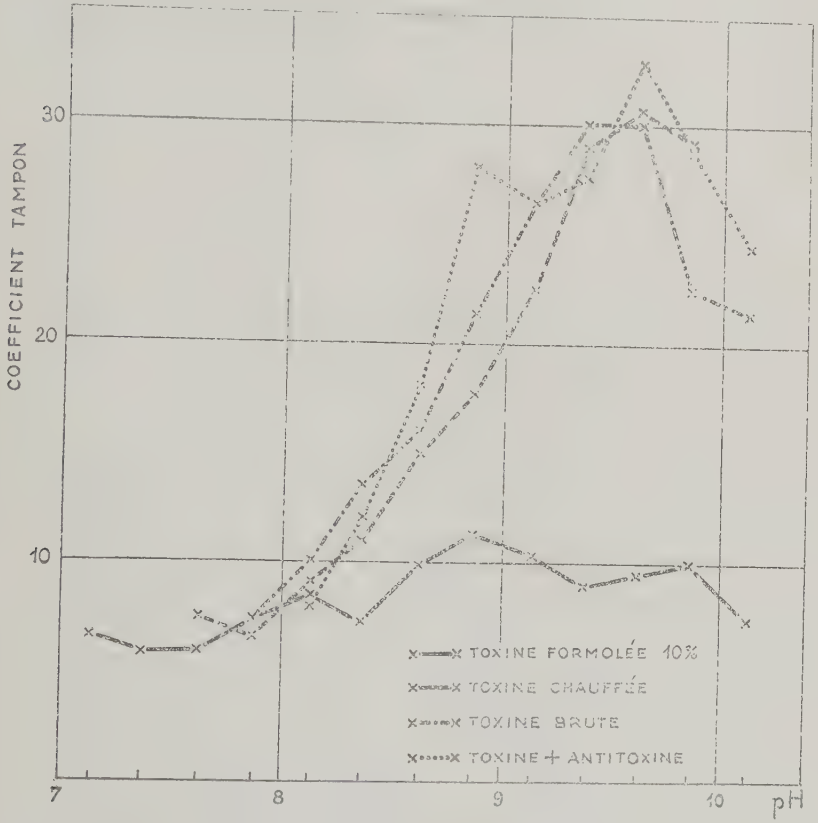

FIG. 12. — Courbes d'effet tampon du Bouillon toxine brut, du Bouillon toxine chauffé, du Bouillon toxine formolé à 10% et du Bouillon toxine après adjonction d'antitoxine.

3. Bouillon toxine plus antitoxine.

Les variations dans la courbe de neutralisation sont ici aussi les plus nettes dans la zone des pK alcalins. Ces variations ne sont pas très constantes.

Nous avons fait des courbes comparatives avec des mélanges et des temps variés et avec des doses variées d'antitoxine.

Sur quatre expériences conduites dans des conditions aussi rigoureuses que possible, nous avons eu des résultats qui ne

sont pas toujours concordants. Nous en donnons deux à titre d'indication (fig. 12 et 13) dans cette dernière, les courbes ont été faites après des temps divers de contact; mais, pour pouvoir étudier les phénomènes de la floculation par cette méthode, il serait plus fructueux d'utiliser des toxines purifiées car, comme nous le verrons plus loin, la partie active de la toxine représente moins du 1/100e du poids sec du bouillon toxine brut.

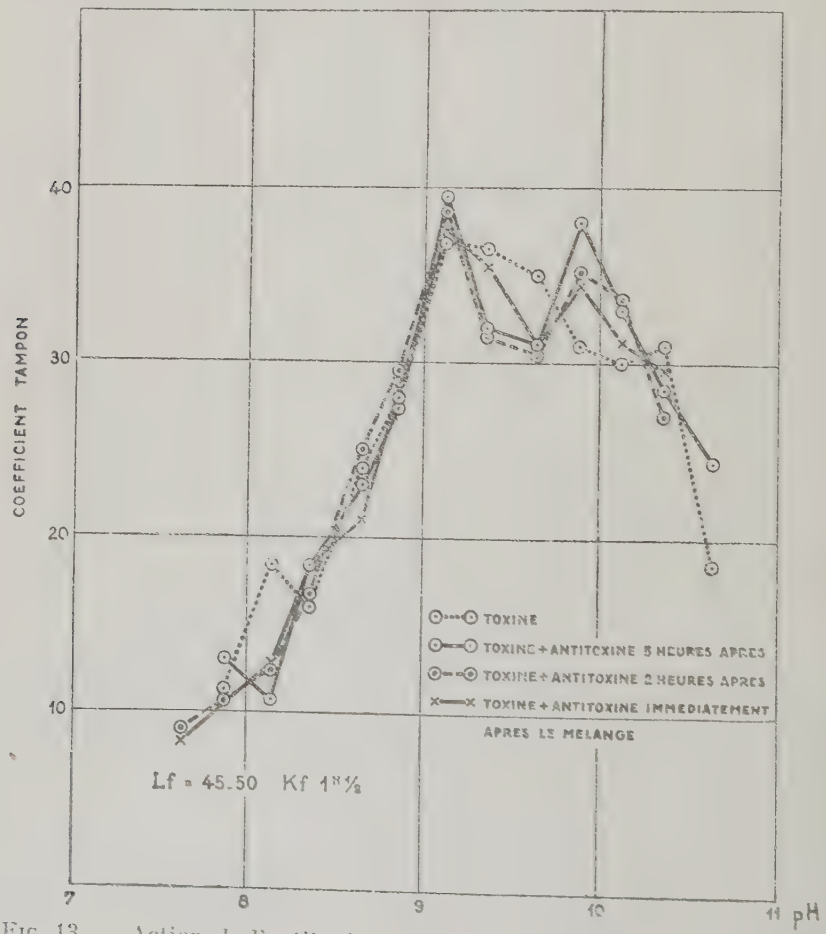

Fig. 13. — Action de l'antitoxine après des temps variés sur la courbe d'effet tampon du Bouillon toxine brut.

4. Bouillon toxine formolé.

Cette action est beaucoup plus intéressante et plus nette. L'action du formol dépend de trois facteurs:

a) sa concentration,

b) le temps de contact,

c) le pH auquel est effectuée la formolisation.

Nous avons donc fait des expériences pour étudier le rôle de chacun de ces trois facteurs.

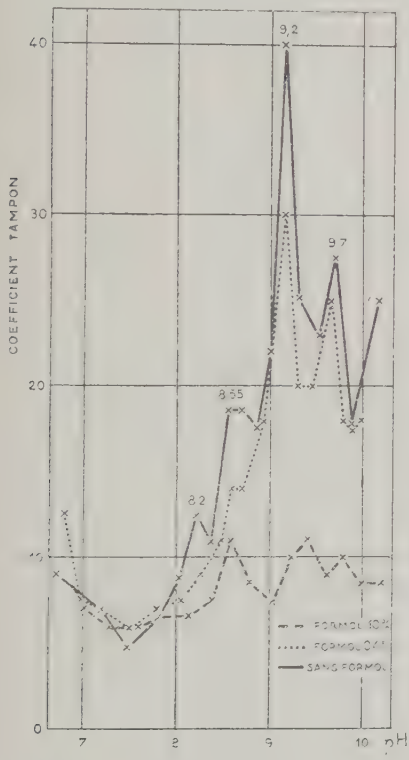

Fig. 14. — Effet du formol à diverses concentrations sur la courbe d'effet tampon du Bouillon toxine après 24 heures.

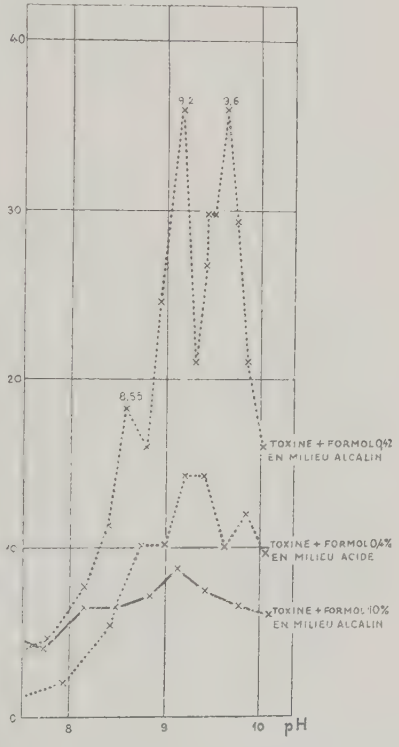

Fig. 15. — Effet du formol à 0,4% en milieux acide et alcalin et à 10% sur la courbe d'effet tampon du Bouillon toxine après 15 jours.

a) *Influence de la concentration:*

Le blocage des fonctions aminées est très influencé par le pourcentage de formol.

Après 24 heures de contact, nous voyons que tous les pK dus aux amino-groupes ont disparu dans le mélange formolé à 10 p. 100; dans le mélange à 1 p. 100, persiste un certain effet tampon (fig. 14).

Mais, chose intéressante, dans le mélange formolé à 0,4 p. 100, c'est-à-dire dans les conditions où l'on fabrique l'anatoxine, les pK des acides aminés restent presque intacts. Nous retrouvons un pK à 8,5, un second à 9,2 et un troisième à 9,6.

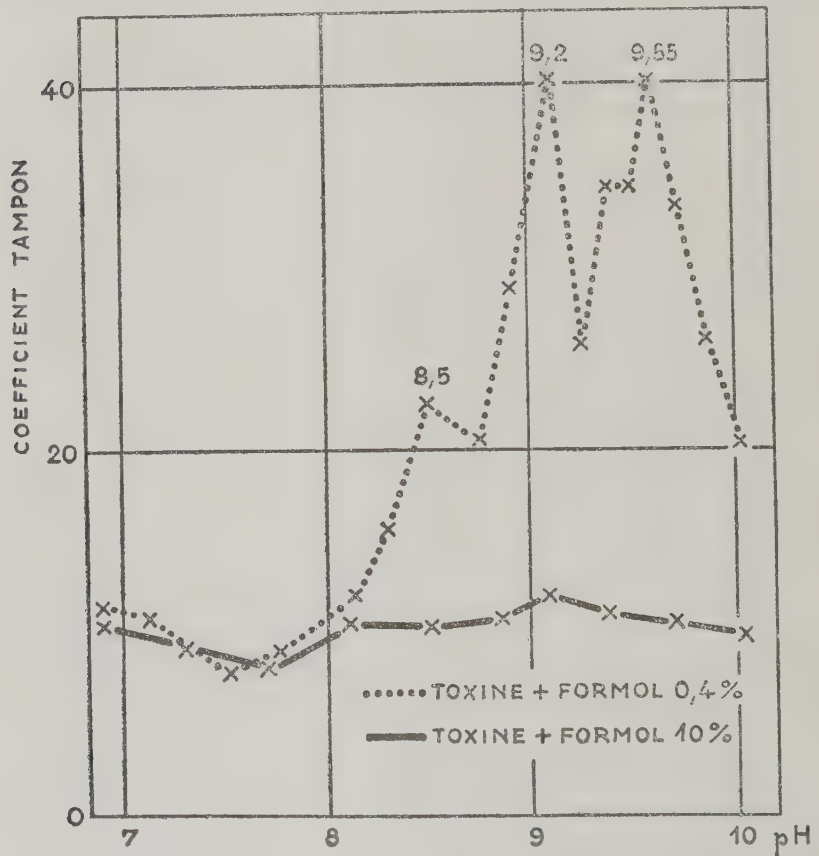

Fig. 16. — Effet du formol à 0,4% et à 10% sur la courbe d'effet tampon après 1 mois.

b) *Influence du temps:*

Après un mois de contact, la courbe d'effet tampon du mélange formolé à 0,4 p. 100 n'a pas beaucoup variée (figure 16). La toxicité du produit est nulle. Les courbes des mélanges à 10 p. 100 et à 1 p. 100 n'ont pas non plus évolué: disparition presque totale des effets tampon dus aux amino-groupes dans le mélange à 10 p. 100.

c) *Influence du pH:*

Lorsque le contact avec le formol est fait en milieu acide (pH = 5), on constate une évolution beaucoup plus rapide du produit et une concentration de 0,4 p. 100 suffit pour faire disparaître les pK dus aux acides aminés (figure 15). Ce mélange dont le pouvoir antigène avait beaucoup baissé, était encore légèrement toxique. Ceci est en accord avec les données de Schmidt et celles de J. Baratte (8).

En résumé, dans les conditions dans lesquelles est fabriquée l'anatoxine, l'action du formol sur les protides est peu marquée; aussi comprend-on que ces dernières n'aient pas acquis une nouvelle spécificité immunologique et qu'elles floculent par l'antitoxine de la même façon que la toxine.

Lorsque l'on opère dans des conditions telles que le formol bloque la plus grande partie ou même tous les groupements aminés, le produit ne flocule plus. En effet, nos mélanges formolés à 1 p. 100 ou à 10 p. 100 ne floculaient pas.

De même, le mélange formolé à 0,4 p. 100, en milieu acide (ramené à pH 8 après 3 semaines) ne floculait plus en présence de l'antitoxine avec cinq unités. La toxine formolée dans les conditions habituelles de préparation de l'anatoxine, conservait, au contraire, toutes ses propriétés floculantes.

Chaque fois que les amino-groupes sont bloqués, on voit donc le pouvoir floculant disparaître. Réciproquement, il persiste chaque fois que ces groupements sont intacts.

CHAPITRE II.

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA TOXINE PURIFIEE.

1. Méthode de purification.

La méthode que nous avons employée dérive de celle qu'a indiquée Boivin (15) : 1) précipitation par l'acide trichloracétique à pH 4; 2) redissolution du précipité dans une solution de phosphate à pH 8; 3) nouvelle précipitation à pH 4,5 en présence d'acétone; 4) redissolution de ce nouveau précipité dans une solution alcaline. On obtient ainsi, à condition d'opérer toujours à froid, une solution dont le poids sec est 100 fois moins grand que celui de la toxine originelle à toxicité égale. La toxicité a diminué de moitié par rapport à la toxine originelle. 25% de la toxine perdue se retrouve dans le premier filtrat et 1/4 est détruit.

Pour pouvoir étudier la courbe de neutralisation et le transport cataphorétique de cette solution, il nous a fallu utiliser un produit concentré, dont la toxicité était 20 fois celle de la toxine originelle. Dans ces conditions, on obtient, avec des réactifs n/20, une courbe d'effet tampon de même allure que celle de la toxine brute.

2. Courbe d'effet tampon.

La toxine ainsi purifiée et concentrée, neutralisée avec des réactifs: n/20 nous a donné la courbe de la figure 17.

Sur cette courbe, nous voyons: 1) un sommet à pH 4,37, suivi d'un minimum pour pH 4,12; 2) un sommet à pH 6,75 et un minimum pour pH 7,50; 3) un pK à 9,8.

Le sommet à 6,75 est vraisemblablement dû à des traces de phosphates qui ont persisté dans la solution et nous n'en tiendrons pas compte.

Par contre, les 2 minima à pH 4,12 et pH 7,50 peuvent être interprétés comme l'image de points isoélectriques. Nous

verrons en effet qu'ils coïncident parfaitement avec les résultats de la cataphorèse.

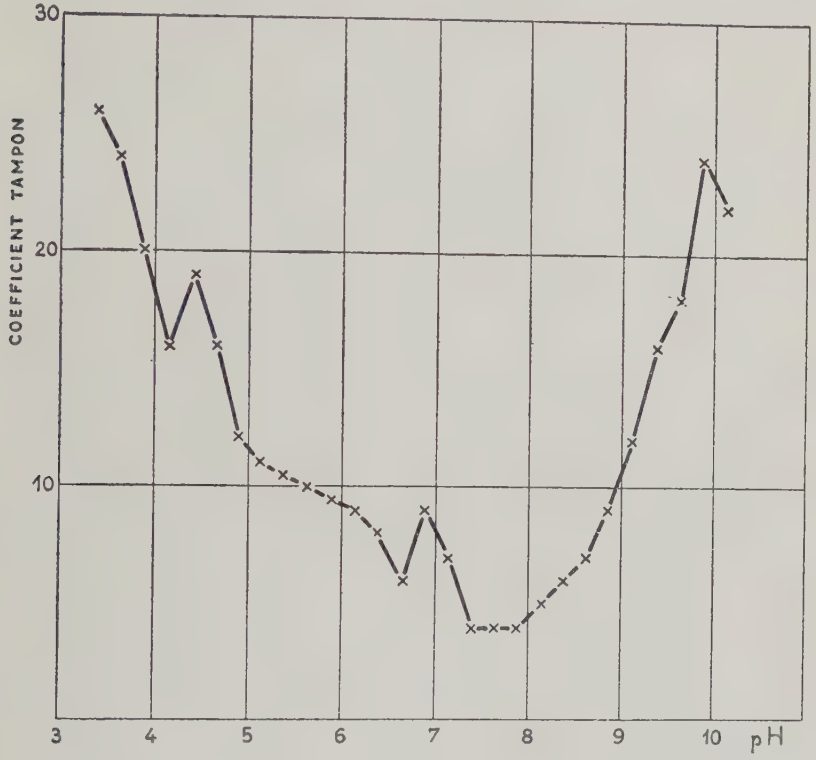

Fig. 17. — Courbe d'effet tampon de la toxine purifiée.

3. **Indice d'alcool.**

L'indice d'alcool, fait en mélangeant un centimètre cube de la solution à différents pH avec un volume égal d'alcool, montre le maximum de précipitation.

Pour plus de précision, il a été fait des lectures photométriques, suivant une technique connue (voir à ce sujet: F. Vlès: Précis de Chimie physique — Vigot édit. Page 309 et F. Vlès et A. de Coulomb: Archives de Physique biologique, t. V 1926, page 204).

Nous donnons ci-joint, figure 18, une courbe dans laquelle sont portés en abscisse le pH et en ordonnée les divisions du photomètre. Le maximum de précipitation se

voit à pH 4,5. L'opacification commence à pH 6. La solution est de nouveau claire à pH 2.

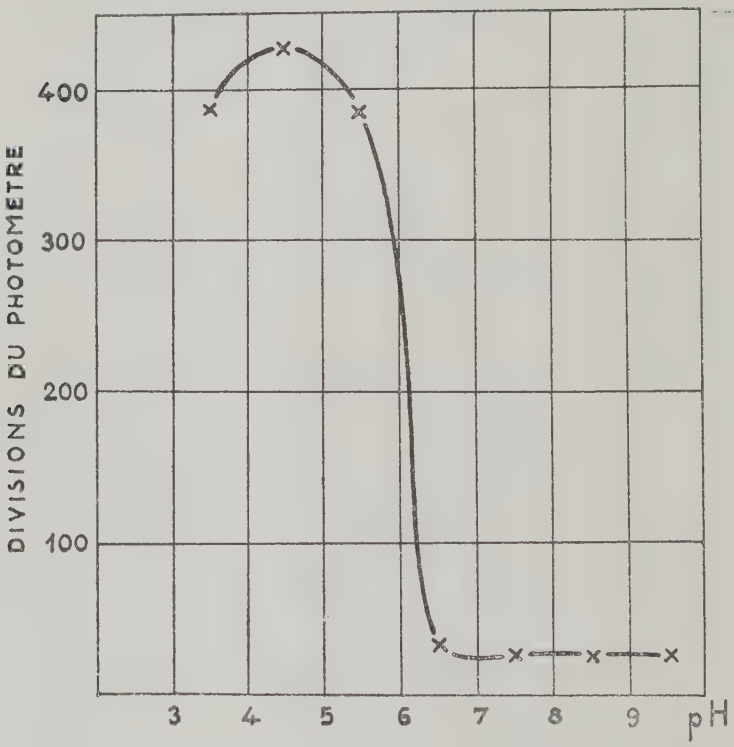

Fig. 18. — Opacification de la toxine purifiée en fonction du pH déterminée par lectures photométriques.

4. Cataphorèse.

Nous avons utilisé la technique mise au point par Vlès *.

La cataphorèse de cette même solution nous a montré un point isoélectrique à pH 4 et un deuxième à pH 7,5. A pH 6.1 on note un point neutre de seconde espèce (figure 19).

Les résultats de la cataphorèse ont été portés en courbe par lecture photométrique de l'opacification, produite dans les tubes (+) et dans les tubes (—), par le mélange alcool acétone (figure 20). Ces résultats concordent encore avec les

*) On trouvera tous les détails de cette technique in: Archives de Physique biologique, tome XIII, 1, page 13. 1936.

premières méthodes, mais ajoutent un fait de plus: la présence dans la solution de deux points isoélectriques: l'un à pH 4, l'autre à pH 7,5.

CATAPHORÈSE

pH :	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	
DIFFERENCES DE POTENTIEL	14	14	14	14	15	14	15	
EXAMEN DIRECT	→	←	←	→	⇄	←	←	
DENSITE PHOTOMÉTRIQUE −	163	164	185	170	184	188,5	201	
DENSITE PHOTOMÉTRIQUE +	164	163	171	178	184	183,5	170	

Fig. 19. — Transport cataphorétique de la solution de toxine purifiée. Lecture directe et lecture photométrique.

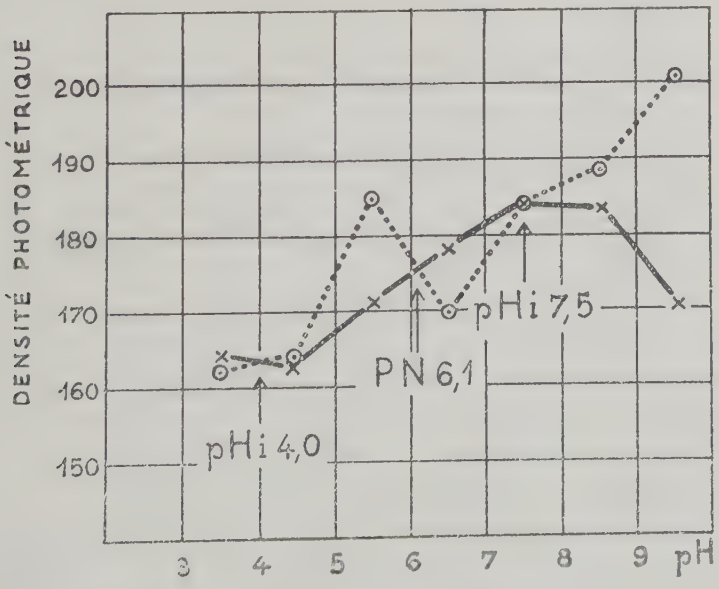

Fig. 20. — Courbes des lectures photométriques de l'opacification produite par le mélange alcool-acétone dans les tubes (+) et les tubes (—) après transport cataphorétique.

5. Discussion.

Différents auteurs ont étudié au point de vue de son point isoélectrique la toxine diphtérique.

Mais les résultats ne sont pas toujours concordants.

Koulikoff (73) le situe à pH 4,8. Sa conclusion est basée sur la précipitation maxima de la toxine brute en fonction du pH. Il constate que le précipité qui se formait à pH 5 jusqu'à pH 2, avec un maximum à pH 3,5, est le plus toxique à pH 4,8. Pour cet auteur, c'est la toxine elle-même qui précipite à ce pH qui serait son point isoélectrique.

Raewsky (120), procédant de même et jugeant du point isoélectrique par le maximum de précipitation arrive à la même conclusion.

Sedaillan et Gaumont, en 1927, arrivent au même résultat.

Par la cataphorèse de toxine obtenue en milieu synthétique, Mayer situe le point isoélectrique dans cette zone (87).

Tous les auteurs, de Potter (116), Locke et Main (75), Thorell et Norlin (148), M.D.Eaton (43), Pappenheimer (106) sont unanimes à considérer ce pH de 4,0 à 4,8 comme le point isoélectrique de la toxine diphtérique (ces derniers auteurs effectuent leurs déterminations sur des produits purifiés).

Certains faits cependant ne semblent pas en accord avec cette conception.

Dernby (31), cherchant à quel pH on observe le maximum d'effet toxique, trouve que c'est à pH 8 qu'on l'observe. Même remarque de Pauli (109).

De Potter (116), étudiant le pH optimum auquel se fait l'union de la toxine et de l'antitoxine, trouve encore pH 8.

Signalons les conclusions analogues de nombreux auteurs, en particulier de Schmidt (136—134), de Mihaesti Ionescu et de Damboviceanu (90).

Comme le fait remarquer F. Vlès *), d'après ce que nous savons des diastases, le point isoélectrique coïncide en général avec le maximum d'activité biologique.

Aussi semble-t-il que ces faits ne soient pas en accord avec les conclusions physico-chimiques.

Si, dans les expériences ci-dessus mentionnées, la plupart des auteurs ne trouvaient qu'un point isoélectrique, ceci peut être attribué au fait qu'ils ont employé des solutions tuant à peine au millième (1/1000e) alors que les solutions sur lesquelles nous avons effectué soit la cataphorèse,

*) F. Vlès: Précis de Chimie physique, page 372.

soit la courbe de neutralisation, étant concentrées de 20 fois, avaient un pouvoir toxique de 20 à 30 fois supérieur; elles tuaient à 1/20.000 ou 1/30.000.

Malgré le haut degré de purification obtenu par de nombreux auteurs, les toxines purifiées ne sont pas «chimiquement pures»; les preuves de pureté données étant encore insuffisantes. Or toute précipitation dans la solution entraîne la toxine par adsorption; il est fatal que l'on confonde le point isoélectrique d'un précipité qui peut être une impureté avec celui de la toxine. Les déterminations faites jusqu'ici ne sont donc pas convaincantes.

CONCLUSIONS.

1° Malgré les progrès réalisés par l'étude des cultures du bacille diphtérique en milieu synthétique, nos connaissances sur le métabolisme du bacille et sur la nature même de la toxine sont encore peu avancées.

Nous avons discuté les diverses questions que posent ces deux problèmes.

2° La toxinogénèse du bacille diphtérique dépend en partie de son métabolisme glucidique.

a) La fermentation des sucres par le bacille aboutit à la formation d'acides qui inhibent la toxinogénèse lorsque le milieu n'est pas suffisamment tamponné par les peptones. Nous avons montré que les peptones Martin et Difco présentent un pouvoir tampon plus élevé que le bouillon bactériologique ordinaire.

b) Les produits intermédiaires du métabolisme glucidique rendent le milieu extrêmement réducteur.

Nous avons montré que le potentiel d'oxydo-réduction descend à des valeurs très basses (R H $\leqslant 2$), que la production de toxine s'effectue pendant cette phase réductrice et s'abaisse lorsque le potentiel du milieu remonte; dans cette dernière éventualité, il est possible que la toxine soit détruite par les enzymes protéolytiques du bacille.

Ces constatations nous semblent particulièrement intéressantes; elles permettent d'expliquer les actions favorisantes ou inhibitrices de divers corps chimiques (cystéine, sels métalliques, glucides, etc...).

3° Nous avons étudié l'action de quelques facteurs sur l'évolution de la courbe d'effet tampon du bouillon toxine (chauffage, addition d'antitoxine, formolisation...) et montré que l'action du formol sur les pK des amino-groupes, peu marquée à la concentration de 0,4 p. 100, l'est beaucoup plus lorsque cette concentration est de 1 p. 100 ou 10 p. 100. Ceci explique que le protide support de la propriété antigène

garde sa spécificité sérologique au cours de la transformation de la toxine en anatoxine et qu'il la perde lorsque l'on emploie des concentrations plus fortes de formol.

Les recherches physico-chimiques que nous avons poursuivies sur la toxine purifiée nous ont montré la présence d'un ampholyte, sinon de plusieurs, que, dans des recherches actuellement en cours, nous nous efforçons d'isoler. Les données de la littérature actuelle sur le point isoélectrique du support protidique de la toxine ne nous semblent pas irréfutables.

Strasbourg, le 13 mars 1939.

Vu : Le Président de Thèse: F. VLÈS.

Vu: le Doyen: André FORSTER.

Vu et permis d'imprimer:

Strasbourg, le 14 mars 1939.

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABT G. — Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen des précipités de phosphate de chaux. — Ann. Inst. Past. t. XLII, 1928, p. 1336-1366.
2. ABT et LOISEAU. — Sur les facteurs de variations du pH dans les cultures du bacille diphtérique. — Ann. Inst. Past., 1925, p. 115.
3. — Réaction du milieu et production de la toxine diphtérique. — Ann. Inst. Past. Juillet 1922, p. 535.
4. ANDO K. and KOMIYAMA I. — Diphtéria toxin, produced on semi synthetic medium. — J. of Immunology, 1935 (28), pp. 331-343.
5. — Purification of diphteria toxin and anatoxin. — J. of Immunology, 1935 (29), p. 439.
6. AUBEL et COLIN H. — Réaction du milieu et filtration des toxines. — C. R. Ac. Sc., t. CLXI, 1915, pp. 506-508.
7. BANZHAF E. J. and HIRSHLEIFER L. J. — Studies in preparation of diphtéria toxin media. — Collected Studies from the research Laboratory Department of Health. New-York, 1916, pp. 225, 226.
8. BARATTE J. — Essai de dissociation des pouvoirs antigène et toxique de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., 12 juin 1937, p. 494.
9. BARIKINE W. et KOULIKOFF. — Ueber das Diphteria Anatoxin und Toxin. — Zeitschrift für Immunität-Forschung und experimenteller Therapie, 1926 (47), pp. 277, 290.
10. BARIKINE, KOULIKOFF, MINERVIN, KIGUCHIN. — Action des aldehydes sur la toxine. — Zeitschrift f. Immunologie (46), 1926, p. 456.
11. BECHHOLD H. — Eine Ultrafiltrationsstudie mit Diphterietoxin und Toxon. — Arbeit aus dem Inst. für exper. Therapie zu Frankfurt a./M.; Iena, 1919, Heft 7, pp. 25-32.
12. BERMANN et STURGIS. — J. of. Bact. 1915, t. I, p. 15.
13. BOIVIN A. — Sur le comportement comparé des endotoxines et des exotoxines vis-à-vis de l'acide trichloracétique. — C. R. Ac. Sciences, 1936 (203), pp. 284-286.
14 — Sur la nature chimique de la toxine et de l'anatoxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol. t. CXXIV, 1937, p. 25.

15. BOIVIN A. et IZARD G. — Méthode pour la purification à l'acide trichloracétique des toxines et anatoxines diphtériques, tétaniques et staphylococciques. — C. R. Soc. Biol., t. CXXIV, 1937, p. 25.

16. BORDET P. — Influence favorisante de la levure sur l'utilisation des glucides et la toxicogénèse par le bacille diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 125, 1938, pp. 1044-1046.

16*bis*. BORDET P. — Facteurs de croissance et toxinogèse. — Rapport au Congrès de microbiologie, 1938, p. 96.

17. BRAUN, J. HOWARD. — Hydrogen ions titration and the Buffer index of bacteriological media. — J. of Bacteriology, 1921.

18. BRAUN et HOFMEIER. — Klin. Wochenschrift 6, 669, 1927.

19. BRAUN H., HOFMEIER K. und MUNDEL F. — Zur Ernährungs-Physiologie der Diphteriebazillen. II. Die Nahrungsbedürfnisse der Diphteriebazillen in synthetischen Nährboden in qualitat. Hinsicht. — Centr. f. Bakt., t. CXII, 530.

20. BRAUN et MUNDEL. — Ueber die Bedeutung des Cystins für die Züchtung der Diphterienbazillen. — Centr. für Bakt. orig. 103, 182, 1927.

21. BRAUN H. und MUNDEL F. — Zur Ernährungsphysiologie der Diphteriebazillen. I.: die Nahrungsbedürfnisse der Diphteriebazillen in synthetischen Nährmedium in quantitativer Hinsicht. — Centr. f. Bakt., t. CXII, 1929, 377.

22. BUNNEY W. E. — Action of formaldehyde on dipht. toxin. — J. of Immunology, Janv. 1931 (20), pp. 47-59.

23 BUNNEY W. E., CIANCIARUBO J. et KIANIL. — Study of acid précipitation of diphteria toxin. — J. of Immunology, Juin 1931 (20), pp. 417-431.

24. CLAVEL Jeanne. — Etude analytique de la toxine diphtérique. — Thèse de Lyon, Box édit., 1929.

25. CROWE M. O'L. — The fluorescent spectrum of a pigment elaborated by the diphteria bacillus. — Proc. exp. Biol. and Med. 37, 1937, pp. 215-216.

26. DANYZ. — Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des mélanges toxines antitoxines. — Ann. Inst. Past., 1902, XVI, p. 331.

27. DAVID et DERNBY G. K. — Etude sur la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., 85, p. 1177, 1921.

28. DAVIS et FERRY. — J. of Bact., t. 17, p. 42, 1919.

29. DAWIS Lewis. — Bacteriologic peptone in relation to the production of diphteria toxin and antitoxin. — J. of. Bact., t. V, sept. 1920, pp. 477-488.

30. DELILLE P. Arm., MAYER A., SCHAEFFER G., TERROINE E. — Culture du B. K. en milieu chimiquement défini. — C. R. Soc. Biol. 1913, 74, p. 272.

31. DERNBY. — On the nature of diphteria toxin. — J. General Physiology, 1926.
32. — Etude sur la formation de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Chimie Biol., 1923,, 88, pp. 109-111.
33. DERNBY K. G. et SIWE S. — Les enzymes protéolytiques du bacille diphtérique et leurs rapports avec la toxine. — Réunion biol. de Suède, C. R. Soc. Biol., 87, 1922, p. 1177.
34. — Die proteolytischen Enzyme der Diphteriebazillen und ihre Bedeutung für das Wachstum und die Toxinbildung derselben. — Biochem. Zeitschrift, t. 134, 1922, p. 1.
35. DERNBY K. G. et WALBUM L. E. — Studien über die Bildung des Diphterie-Toxins. — Biochem. Zeitschrift, t. 138, 1923, pp. 505-560.
36. DHERE Ch. et CASTELLI V. — Relations entre les spectres d'absorption et de fluorescence du bouillon toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., 127 p. 1050.
37. DOYON M. — Mode d'action de certaines toxines microbiennes. — C. R. Soc. Biol., t. 87, 1922, p. 1352.
38. DUBOS. R. — Observations on the oxidation reduction properties of sterile bacteriological media. — J. of. exp. Med., 1929, 49, p. 507.
39. DUCLAUX. Critique du mémoire de Brieger et Fränkel. (Berl. klin. Wochenschr., 1890, n° 11). — Ann. Inst. Past., 1890, p. 380.
40. EATON M. D. — Flocculation reaction with purified diphteria toxin. — Journal of Immunology, 1936, t. 30, pp. 361-372.
41. — Purification and concentration of diphteria toxin. Evaluation of previous methods; description of new procedure. — J. of Bacteriology, avril 1936 (31), pp. 347-366.
42. — The purification of diphteria toxin: separation of toxin from bacterial protein. — J. of Bacteriology, 1937, t. XXXIV, p. 139.
43. — Recent chemical investigations of bacterial toxins. — Bact. Reviews, Vol. 2, n° 1, Juin 1938, pp. 3-45.
44. ECKER E. E. and WEEL L. A. — Studies on adsorption of diphteria toxin to and elution from magnesium hydroxide. — J. of Immunology, 1932 (22), pp. 61-66.
45. EHRLICH P. — Ueber Giftcomponenten des Diphterie-Toxins. — Berliner klin. Wochenschrift, 1903, XI, 793, pp. 825-848.
46. FREUND J. — On nature of toxin-antitoxin neutralization studied on collodion particles. — Proced. of. soc. exp. Biol. and Med., 1931 (28), pp. 1010-1012.
47. FREUND. — On the mechanism of toxin antitoxin reaction. J. of Immunology, Août 1931 (21), pp. 127-137.
48. GALLIMARD et LACOME. — J. Physiol. et Path. Générale, 9, 481, 1907.

49. GEX. — Revue des techniques de l'électrode d'antimoine en différentiel pour la mesure du pH. — Archives de Physique biologique, IX, page 110, 1931.

50. GINS and JERMOLJEWA. — Beiträge zur Morphologie und Biologie der Diphterie-Bazillen. — Zeitschrift für Hygiene, CIX, 26, 1928.

51. GOLDIE H. — Substances oxydoréductrices des filtrats microbiens toxiques. — C. R. Soc. Biol., 1933, 114, p. 602.

52. GRÖER von F. — Diphterientoxin-Studien. — Bioch. Zeitschrift, 1923, 138, pp. 13-33, 1923, 138, pp. 34-42.

53. GRÖER von F., ALTENBERG E., TIDLE F. — Ueber den Einfluss gewisser chemischer Complexe auf die Giftigkeit bakterieller Toxine. 1) Der Einfluss der Dioxyphenol auf das Diphterie-Toxin. — Zeitschr. f. Immunität-Forschung, t. LXXXVII, 1936, p. 229.

54. HADLEY PH. B. — The growth and toxin production of diphteria bacillus upon protein free media. — J. of. infect. dis. suppl. 3 mai 1907, p. 95.

55. HALLAUER. — Zeitschrift f. Hygiene und Infect., 105, 1925, p. 138.

56. HARTLEY P. — The value of Douglas medium for the production of diphteria toxin. — J. of. Pathology and Bacteriology, 1922 (25), p. 479.

57. HARTLEY P. and HARTLEY O. — The routine preparation of diphteria toxin. — J. of Path. and Bact., 1922 (25), p. 458.

58. — Toxin and reaction changes produced by the diphteria bacillus in culture. — J. of Path. and Bact. 1922 (25), p. 468.

59. HAZIN E. L. and HELLER G. — Effect of various carbohydrates on production of diphteria toxin with special reference to its flocculating power. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., Janv. 1931 (28), pp. 423-425.

60. HEEREN Ralph. H. — Relation of pellicle formation and toxicogenicity of diphteria toxin. — J. of Inf. Dis., 1930, XLVI, p. 161.

60bis. HEWITT L. F. — Oxidation reduction potentiels in Bacteriology and Biochemistry (1936), London County Council.

61. HIDA O. — Ueber die Bedeutung der Peptone für die Bildung des Diphterie-Toxins. — Zeitschrift f. Hygiene und Infektions-Krankheiten, Leipzig, 1908 (61), pp. 273-281.

62. HIDA et SUSUKI. — Biological and chimical analysis of the diphteria toxin production in media. — Kitasato, Arch. of exp. med., 14, pp. 263-313.

63. — Cultural requirements for toxin production. — Kitasato, Arch., 14, pp. 263-313.

64. HITCHENS. — Journal of Med. Research, 13, 1905.

65 HOSOYA S. K., KAGABE T., TANAKA A., MONNA. — Etudes sur la nature de la toxine diphtérique, l'anatoxine purifiée pulvérulente. — C. R. Soc. Biol., t. 120, 1935, p. 1030.

66. HUGOUNENCQ et DOYON. — Les milieux de culture définis. — C. R. Soc. Biol., 18 avril 1896.

67. JENSEN Cl. — Préparation des lapins destinés à l'intradermoréaction diphtérique. — C. R. Soc. Biol. 1931, 107, p. 337.

68. JOHNSON S. J., PAPPENHEIMER Jr. A. M., ROBINSON E. S. — An improved gelatin hydrolysate medium for diphteria toxin production. — J. of. Bact., t. XXXV, 1938, p. 8.

69. KLIGLER L., LEIBOWITZ, BERMANN. — The effect of ascorbic acid on toxin production by C. Diphteria in culture media. — J. of Path. and Bact., 1937, II, p. 415.

70. KOLMER J. A. et MOSHAGE E. L. — Relation to carbohydrate splitting ferment to soluble toxin of diphteria bacilli. — J. of Inf. Dis., 19. 28. 1926.

71. KOSER St. and RETTGER L. — Studies on bacterial nutrition. The utilisation of nitrogenous compounds of definite chemical composition. — J. of Infect. Dis., t. XXIV, 1919, p. 301.

72. — Studies on bacterial nutrition. A comparative study of the growth promoting properties of various substances. — J. of. Infect. Dis., 62, 1938, 209.

73. KOULIKOFF V. et SMIRNOFF P. — Nature physicochimique de la toxine et de l'anatoxine diphtérique. — Ann. Inst. Past., nov. 1927 (41), pp. 1166-1174.

74. KOULIKOFF, SMIRNOFF et Mme BOBKOWA. — Conditions physico-chimiques de la thermostabilité de la toxine diphtérique. C. R. Soc. Biol., t. XCVIII, 1928, pp. 1412.

75. LOCKE et MAIN. — The nature of diphteria toxin. — J. of infect. Dis., 1928, n° 43, pp. 41-59.

76. — The respiratory catalysts of the diseases producing bacteria. — J. of. infect. Dis., XLVI, 393, 1930.

77. — The relation of copper and iron to production of toxin and enzyme action. — J. of Infect. Dis. XLVIII, 419, 1931.

77bis. LOISEAU (voir Philippe 111bis).

78. LWOFF A. et Mme LWOFF. — Sur la nature du facteur V. — C. R. Ac. des Sciences, 203, pp. 520-522, 1936.

78bis. LWOFF. — Facteurs de croissance des microorganismes. — Rapport 1er Congrès Microbiologie, octobre 1938, page 60.

79. MAC CONKEY A. — On the production of the diphteria bacillus. - J. of Hygiène, t. XII, 1912, p. 507.

80. MADSEN T. — La constitution du poison diphtérique. — Ann. Inst. Past., 1899, pp. 801-832.

81. MARBE, ANTINESCU, DIMITRIU et STEFANESCO. — Sur le temps nécessaire à la maturation d'une toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., p. 150, t. 112, 1933.

82. MARBE, DIMITRIU et STEFANESCO. — Production de la toxine diphtérique, influence de l'acétate de soude, glucose et maltose. — C. R. Soc. Biol., t. 113, 1933, pp. 487-489.
83. MARBE et OLARIU. — Formule simple de préparation d'une toxine de haute valeur antigénique. — C. R. Soc. Biol., 1935, t. 118, p. 1673.
84. MARIE P. — Revue générale: toxine diphtérique. — Ann. Inst. Past. XI, pp. 473-521.
85. MARTIN L. — Production de la toxine diphtérique. — Ann. Inst. Past., 12, p. 26.
86. MAVER M. M. — The growth and toxin production of C. Diphteria in synthetic medium. — J. of Infect. Dis., 1930, p. 384.
87. — The chemistry of diphteria toxin produced in synthetic medium. — J. of Infectious Diseases, 49, 1931, p. 1.
88. — Attenuation of bacillus produced in synthetic medium. Dissociation, antigenic relations and fermentative reactions. — J. of Infect. Dis., 49, 9, 1931.
89. MEARA R. A. Q. — Some factors which influence reduction in broth and their bearings on the growth of cl. tetani. — J. Path. and Bact., t. XLV, 1937, p. 541.
90. MIHAESTI Ionescu et DAMBOVICEANU. — Sur la neutralisation de la toxine diphtérique par l'antitoxine correspondante. Influence de la réaction du milieu. — C. R. Soc. Biol., 1923, t. 89, p. 504.
91. MODERN F. et RUFF G. — Concentration et purification des toxines et toxoïdes par ultrafiltration. — C. R. Soc. Biol., 1936, (123), pp. 69-70.
92. MOLONAY P. J. et HANNA L. — Contribution to study of diphteria toxin. — Proc. for. exp. biol. and med., t. XIX, 1921, p. 24.
93. MUELLER J., HOWARD. — Nicotinic acid as a growth accessory substance for the dipht. bacillus. - J. Bact. (34), 1937, pp. 429-441 et id.: p. 163.
94. — ß alanine as a growth accessory substance for the dipht. bacillus. — J. Bact. (34), 1937, pp. 381-386.
95. MUSTAFA A. — Le rôle favorisant de certains composants de l'extrait de levure dans la production de toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 126, 1937, p. 558.
96. — Le rôle de certains facteurs de croissance dans la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol. 1937, t. 125, p. 615.
97. NELIS. — Action des sels de quinine sur la toxine. — C. R. Soc. Biol., 1925.
98. NICOLLE M. — Les antigènes et les anticorps. — Masson 1920.
99. NICOLLE M. et CESARI E. — Colloïdes — Catalyse — Antigènes, anticorps. — Ann. Inst. Past., XXXVI, 1922, p. 463.

100. NICOLLE M., CESARI E. et DEBAINS E. — Etudes sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes: sérums antitoxiques. — Ann. Inst. past., t. 34, 1920, p. 596.

101. OHYAMA S. — Sur la purification de la toxine diphtérique. J. of Biochim., Avril 1931 (6), pp. 67-97.

102. OTTENSOOER F., KRUPSKI A. et ALMASY. — Ueber das Spektrum des Diphterie-Toxins. — Biochem. Zeitschrift, 1935 (277), pp. 314-319.

103. PACHIONI D. — Question of enzymatic nature. — Pathologica, 30, 1 à 7.

104. PAPPENHEIMER. — Production of potent diphteria toxin on a simple amino acid medium. — Brit. Journal Exp. Path. t. XVII, 1936, p. 342.

105. PAPPENHEIMER ALWIN J., MUELLER J. HOW. et COHEN S. — Production of potent diphteria toxin on a medium of chemically definite composition. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 36, 1937, pp. 795-796.

106. PAPPENHEIMER ALWIN. — Isolation and characterization of a toxic protein from corynebacterium diphteria filtrates. — J. of Biol. Chem., 120, 1937, pp. 543-553.

107. PAPPENHEIMER et JOHNSON S. J. — Studies in Diphteria toxin production. III A simple gelatin hydrolysate medium and some properties of the toxin produced thereon. — Brit. Journal Exp. Path., t. XVIII, Juin 1937, p. 239.

108. PAPPENHEIMER et JOHNSON S. — Studies in diphteria toxin production. The effect of iron and copper. — Brit. Journal Exp. Path., t. XVII, 1936, p. 335.

109. PAULI. — De l'influence du pH sur l'activité de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., 1934, 116, p. 883.

110. PESCH K. L. — Chemische und physikalisch chemische Diphterientoxinstudien. — Münchener medizin. Wochenschrift, 1925 (72), p. 1184.

111. PESCH K. L. — Beitrag zur Frage der Diphteriegiften. — Archiv f. Hygiene, 1928 (4), pp. 386-395.

111bis. — PHILIPPE et LOISEAU. — Techniques de préparation du bouillon Martin. — C. R. Soc. Biol., 112, (1933), p. 131 et p. 426; 116, (1934), p. 1214 et 117, p. 1056.

112. POPE C. G. — Production of toxin by C. diphteriae; effects produced by additions of iron and copper to medium. — Brit. Journal Exp. Path. Juin 1932 (13), pp. 218-223.

113. — Production of toxin by C. diphteriae; Energy sources. — Brit. Journal Exp. Path. Juin 1932 (13), pp. 207-217.

114. POPE C. G. and HEALEY M. — The influence of maltose on the growth and toxin production of C. Diphteriae. — Brit. J. Exp. Path., XIV, 77, 1933 et XIV, p. 87.

115. POPE G. and SMITH M. L. — The routine preparation of diphteria toxin of high value. — J. of Path. and Bact., 1932, II, p. 573.
116. POTTER, de. — L'action de l'acide chlorhydrique sur la toxine diphtérique et sur le complexe toxine-antitoxine. — Bull. Acad. Royale de Méd. de Belgique, 1923, pp. 394-415.
117. PRIGGE. — Experimentelle Untersuchungen über die Entstellung des Diphteriegiftes. — Zeitschrift f. Immunitätsforschung, t. LXXVII, 1932, p. 421.
118. PREVOT A. R. — Recherches sur la toxinogenèse tétanique. — Ann. Inst. Past., 62, p. 126, 1939.
119. QUINOCHET. — Contribution à l'étude de la toxine du bacille diphtérique. — C. R. Soc. Biol., 4, 480, 1892.
120. RAEWSKY A. S. Ueber den isoelectrischen Zustand toxinhaltigen Bouillons. — Biochem. Zeitschrift, t. CXCVII, 1928, pp. 8-13.
121. RAMON G. — Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtériques. Pouvoir floculant et propriétés immunisantes. — Ann. Inst. Past., t. 38, 1924, p. 1.
122. — Sur la production d'une toxine diphtérique très active. — C. R. Ac. des Sciences, 189, 1929, p. 718.
123. — Sur la production de la toxine diphtérique de valeur antigène intrinsèque très élevée. — C. R. Soc. Biol., 112, 1933, p. 8.
124. RAMON G. et BERTHELOT A. — Nouveaux essais sur la production de toxine et d'anatoxine diphtérique de valeur antigène intrinsèque élevée. — C. R. Soc. Biol., t. 110, 1932, p. 530.
125. REINER I. — Adsorption of diphteria toxoïd by cellulose derivatives and iron hydroxid gel. — J. of Immunology, t. XXIV, p. 221.
126. ROBINSON G. H. MEADER P. D. — The use of tissue in broth in the production of dipht. toxin. — J. of Inf. Dis. t. XXVII, 1920, p. 106.
127. ROBINSON et RETTGER L. E. — J. Med. Research, 36, 357, 1917.
128. ROUX et YERSIN. — Contribution à l'étude de la diphtérie. — Ann. Inst. Past. (3), 1889, p. 273.
129. SBARSKY B. et SOUBKOWA. — Contribution à l'étude de l'immunité: de l'influence des amino acides sur la toxine diphtérique. — J. Biol. et méd. exp. (Russe), t. 1, fasc. 4.
130. SCHÆFFER G. — Facteurs accessoires de la croissance des microorganismes: vitamines, auximones. — Bull. Inst. Past. 1919,XVII, n° 1, pp. 1-21 et n° 2, pp. 41-59.
131. SCHAEFFER G. (en collaboration avec A. DELILLE, MAYER A. et TERROINE E.). — Contribution à la Biochimie des microorganismes: le bacille tuberculeux en milieu chimiquement défini. — Journal Physiol. et Pathologie, t. XV, pp. 797-811, 1913.

132. SCHEEF G. and SCHEEF I. — Mechanism of the production of diphteria toxin. The role of sulfur compounds and copper and iron. — J. inf. Dis., 54, 1934, p. 221.
133. SCHMIDT S. — Sur la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 106, 1931, p. 308.
134. — Toxines et antitoxines. — Ann. Inst. Past., 1930, 45, p. 337.
135. — De l'action de la formaldehyde en concentration élevée sur la toxine diphtérique. — Acta path. et microb. scand., t. XI, n° 3, 1934, p. 270.
136. — Influence de la concentration en ions hydrogène sur la réaction entre toxine antitoxine diphtériques. — C. R. Soc. Biol., t. 103, 1930, p. 625.
137. SCHMIDT S. et NIELSU. — Importance du pH pour la formation de l'anatoxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 112, p. 106.
138. SCHNEIDER Bruno. — Versuche über den Einfluss verschiedener Lebensbedingungen auf die Morphologie und biologische Veränderlichkeit von Diphteriebazillen. — Zentr. für Bakt. I orig., t. CXXI, 213, 1931.
139. SIEBEMANN C. — Influence of aération and diffusion on toxin formation by C. Diphteriae. — J. of Path. and Bact. 1936, 43, p. 261.
140. — Retractometric and chemical study of diphteria toxin. — J. of Immunology, oct. 1936 (31), pp. 257-268.
141. SIERAKOWSKI et ZAGDEL. — Purification de la toxine diphtérique par ultrafiltration et précipitation à pH convenable. — C. R. Soc. Biol., t. 102, 1929, p. 107.
142. SIVORI L. et MANNUTI G. — Scell diverse comportamento del protere tossico et del potere neutralizzante della tossina difterica i del siero antidifterico in rapporte al loro stadio scissione idrolitica. — Riforma medica 1934, n° 5, p. 173.
143. SORDELLI A. et WERNICKE. — L'influence des sucres sur la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., LXXXIV, 1921, p. 176.
144. SMITH. — Journal of Bact., 34, 1937, p. 585.
144bis. SMITH Th. — Journal of Med. Research, 13, 1905.
145. SPRONCK. — Sur les conditions dont dépend la production du poison dans les cultures diphtériques. — Ann. Inst. Past., 9., p. 758.
146. TASCHMANN A. und Van WAASBERGEN. — Reinigung von Diphterietoxin und Anatoxin, vergleichende Reinigungen durch Adsorption an Aluminium-Hydroxyd-Suspension und Fällung mit Aluminium-Sulfat. — Zeitschrift für Immunität-Forschung und experimentelle Therapie, 1932 (75), pp. 164-172.
147. TAYLOR E. M. — Un nouveau milieu de culture pour la production de la toxine diphtérique. — Ann. Inst. Past., oct. 1935 (55), pp. 474-485.

148. THORELL H. et NORLIN G. — Hochgereinigtes Diphtherieantigen. — Zeitschrift für Immunität-Forschung, t. XCI, 1937, p. 62.

149. UTSCHINSKY N. — Nature des poisons de la diphtérie et du cholera. — Archives de Méd. exp. et d'anatomie path., 3, 293, 1893.

150. — Ueber Diphteriekultur auf eiweissfreie Nährlösung. — Centr. f. Bakt., 21, 146, 1897.

151. VELLUZ L. — Fonctions aminées et inactivation des toxines microbiennes. – C. R. Soc. Biol., t. 127, 1938. p. 35.

152. — Inactivation de quelques toxines par la papaïne. — C. R. Soc. Biol., t. 128, 1938, p. 132.

153. — Sur l'application du dimedon à l'étude des toxines formolées. — C. R. Soc. Biol., 8 t. 111, 1932, p. 289.

154. VINCENT H. et VELLUZ L. — Sur les propriétés cryptotoxiques de l'α oxynaphtate de sodium — son action spéciale sur la toxine diphtérique. — C. R. Acc. des Scienc., 17 mai 1932 (194), pp. 1697-1699.

155. VLES F. — Note sur l'électrode d'antimoine. — Arch. Physique biologique VI, p. 92, 1927.

156. — Précis de Chimie Physique. — Vigot, éditeur.

157. WADSWORTH A., CROWE M. O'L. et SMITH L. A. — The spectroscopic investigation of Bacterial toxins; the adsorption spectra of the products of C. Diphteriae. — Brit. J. exp. Path., t. XVI, 1935, p. 201.

158. WADSWORTH A. et QUIGLEY J. J. — Studies on purification of diphteria toxin by ultrafiltration. — American Journal of Hygiène, Juillet 1934 (20), pp. 225-232.

159. WADSWORTH A., QUIGLEY J. J. et SICKLES R. — Preparation of diphteria Toxoïd. The action of formaldehyde. Precipitation by calcium. J. of Inf. Dis., t. LXI, 1937, pp. 237-241.

160. WADSWORTH A. and WHEELER M. — Attenuation and toxin production of dipht. bacillus — synthetic medium — factors affecting growth and toxin production. — J. of. Inf. Dis., 1928, t. I., p. 179.

161. — The attenuation and toxin production of the diphteria bacillus. IV in infusion free peptone medium. V in synthetitic med. J. of. Inf. Dis., 1934, t. LV, p. 123.

162. WADSWORTH A., WHEELER M. and MENDEZ L. — The attenuation and toxin production of the diphteria bacillus. VI Ultrafiltration of toxins produced in peptone dialysate med. — J. of Inf. Dis., Vol. 62, p. 129.

163. WALBUM E. E. — Action du chlorure de manganèse sur la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 85, p. 619, 1921.

164. — Sur la production de la toxine diphtérique. — C. R. Soc. Biol., t. 87, 1922, p. 1224.
165. WALBUM L. E. — Studien über die Bildung der bakteriellen Toxine. II. Diphterie toxine. II. Bildung des Diphterie-Toxins. — Biochemische Zeitschrift, 1922 (130), pp. 25-67, 1922/23 (134), pp. 601-605.
166 — Das Diphterie-Toxin. — Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. XIII, 1925.
167. WATSON A. F. and LANGSTAFF E. — Influence of cultural conditions on production of diphteria toxin. — J. of Path. and Bact., 1927 (21), pp. 426-433.
168. WATSON A. F. and WALLACE U. — Diphteria toxin production on Douglas medium. — J. of Path. and Bact., 1923 (26), pp. 447-458.
169. — Changes in the culture medium during the growth of Bact. diphteriae. — J. of Path. and Bact., 27, 272, 1924.
170. — The concentration of diphteria toxin by acid precipitation. — J. of Path. and Bact., 1924, p. 289.
171. WHEELER M. W. and CROWE M. O. — Note on conditions affecting production of toxin and prophyrin by diphteria bacillus. — J. of Bacteriology, mai 1936 (31), pp. 519-521.
172. WHERRY W. B. — Influence of oxygen tension on morphologic variations. — J. of Infect. Dis., 21-47, 1917.
173. WILCOX H. C. — Effect. of peptone on toxigenic property of Bact. dipht. n° 8. — J. of Infect. Dis., 30, 536, 1922.

Table des matières

Préface.

Introduction.

Définition — tests de dosage.

PREMIERE PARTIE:

Conditions physico-chimiques de la culture du bacille diphtérique en vue de la production de la toxine.

I. — *Evolution du pH dans les cultures.*

Etude des courbes d'effet tampon des milieux de culture.

1. Technique.
2. Résultats:
   a) bouillon ordinaire,
   b) bouillon Martin,
   c) milieu de Marbe et Olariu,
   d) bouillon-toxine filtré.
3. Conclusions.

II. — *Rôle du rapport volume/surface.*

Evolution du rH de la culture.
Résultats — Interprétation des résultats.

III. — *Facteurs chimiques.*

1. Culture sur milieux dépourvus d'albumoses et peptones.
2. Rôle des acides aminés: milieux synthétiques.
3. Facteurs de croissance.
4. Rôle des sels:
   a) manganèse,
   b) calcium,
   c) cuivre et fer.

5. Rôle des substances ternaires:
   a) glucides,
   b) acétate de soude et lactate de soude.
6) Expériences personnelles — Conclusions.

DEUXIEME PARTIE:

I. — *Etude du bouillon toxine par la courbe de neutralisation* et d'effet tampon.

1. Bouillon toxine brut.
2. Bouillon toxine brut chauffé
3. Bouillon toxine brut et antitoxine
4. Bouillon toxine brut formolé.

II. — *Etude physico-chimique de la toxine purifiée.*

1. Méthode de purification.
2. Courbe d'effet tampon.
3. Indice d'alcool.
4. Cataphorèse.
5. Discussion.

Conclusions.